

Експрес – метод визначення токсичності промислової риби ураженої личинками анізакід з використанням інфузорії *Colpoda Steinii*.

Є.Ю. Розум, О.В. Оніщенко
Одеський державний аграрний університет

*Проведеними дослідженнями встановлено, що визначення токсичності промислової риби, ураженої личинками анізакід, мікробіологічним методом з використанням інфузорії *Colpoda Steinii* [10] по достовірності не відрізняється від досліджень на лабораторних тваринах (білі миши) і тому ми пропонуємо його для використання в лабораторіях ветеринарно – санітарної експертизи на ринках. Пропонуємий мікробіологічний метод визначення токсичності риби легко виконується у виробничих умовах і дає змогу отримати результати досліджень за 10хв – 3 год.*

Збільшення поставок на внутрішній ринок України морської риби та інших гідробіонтів із різних регіонів Світового океану, підвищило ризик інвазування людей збудниками зооантропонозних гельмінтозів, які раніше в Україні реєструвалися спорадично, на прикладі – анізакідозу. Висока зараженість личинками анізакід усієї промислової риби обумовлює їх епідеміологічну значимість для ринку України, куди надходить більш як 25 видів риби з різних регіонів Світового океану і промислової риби – окунь, судак та інших хижих риб, які виловлюються з внутрішніх водоймищ Північно – західного Причорномор'я. [3, 5, 6, 12, 14]

Анізакідоз – це гельмінтози, які викликаються личинками деяких представників нематод родини Anisakidae (*Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens*, *Contracaecum esculatum*) становить одну з найбільш соціально і економічно вагомих паразитарних проблем України. [9, 12]

Зараженість промислової риби з морів, океанів і внутрішніх водоймищ личинками анізакід варіює залежно від виду гідробіонту, його екології, віку, району і сезону вилову.

Паразити локалізуються у порожнині тіла, на поверхні і у середині внутрішніх органів (ікра, молоки) та у м'язах риби. Личинки паразитів можуть бути у згорнутому стані (у формі спіралі, кільця) або витягнутими, вони містяться у напівпрозорих капсулах (цистах) чи без них. Личинки білого, коричневого і жовтого кольору, добре помітні візуально, їх розміри коливаються від 0,5 до 4,5см. [4]

З літературних джерел відомо, що живі личинки анізакідних нематод мають токсичні та алергічні властивості. [4, 7, 8]

Проведеними дослідженнями підтверджено, що після знезараження анізакідних личинок заморожуванням та проварюванням токсичні властивості останніх зникають, а алергічні помітно знижуються, порівняно з живими личинками. Інші автори вказують, що нематоди різних видів і родів по різному реагують на дію температури, кухонну сіль та інші фактори. Личинки анізакід гинуть при заморожуванні та витримуванні риби при низьких температурах, тепловій обробці, солінні у міцному розсолі та маринуванні. [9]

Метою нашої роботи було встановити токсичність м'яса та інших харчових частин оселедцю уражених личинками анізакідних нематод, які реалізуються на ринках м.

Одеси, з різною інтенсивністю і екстенсивністю ураження, з використанням тест – об'єкту для токсикобіологічного експрес методу інфузорії *Colpoda Steinii*.

Матеріал і методи дослідження.

Дослідження проводилися в лабораторії кафедри ВСЕ та фармакології на зразках свіжоморожених атлантичних оселедців, уражених личинками анізакідних нематод, з різною інтинсивністю інвазії які реалізуються на ринках м. Одеси. Дослідження на токсичність проводили з використанням мікробіологічного метода на інфузорії *Colpoda Steinii*. [1, 2, 10] Інфузорія *Colpoda Steinii* у сухому стані може кілька років зберігати свою життєздатність. На підставі сухої культури в сучасних умовах розроблено тест – набір для токсикологічної оцінки кормів, які в Одесі виробляє НВПТЗОВ «Відродження». [10, 11]

Метод оснований на вилучені з досліджуваних продуктів різних фракцій токсичних речовин водою та подальшою дією цих екстрактів на культуру інфузорії *Colpoda Steinii*. [10, 11, 13]

Для проведення досліджень необхідно за 12 – 24 години підготувати культуру інфузорії при температурі 26–28°C. Безпосередньо перед проведенням досліджень перевіряють активність колподи, для чого культуру досліджують методом роздавленої краплі під мікроскопом (збільшення від 80× до 150×). Наявність у полі зору не менше 5 клітин, які активно рухаються, підтверджує активність колподи. Після цього культуру інфузорії переносимо по 1см³ у два чисті стерильні флакончики (один для піддослідного зразка, другий – для контролю). Для визначення токсичності риби, відбирали проби згідно з ГОСТ 7631 – 85 і 13496.0 – 80. Піддослідні проби з риби подрібнювали. З подрібнених проб масою по 20г при додаванні в колбу місткістю 250мл 100мл дистильованої води, струшуванням на апараті АБУ – 1 протягом 20 хвилин, робили піддослідні екстракти, які після приготування фільтрували. Після цього у флакон з активною культурою колподи вносили 1см³ профільтрованого екстракту піддослідного продукту, у контрольний флакон вносили 1см³ дистильованої води. Флакон ставили у термостат на весь період досліду при температурі 26–28°C. Контроль за життєздатністю інфузорій проводили мікроскопічно через 10 хвилин і 3 години, при цьому визначали зменшення кількості інфузорій чи їх відсутність, наявність аномальних рухів і форм в полі зору. Критерієм визначення токсичності є час від початку дії водного екстракту продукту, що досліджувався, до загибелі більшості інфузорій, факт який констатували на основі повного припинення їх руху і наявності розпаду. У контролі всі колподи були рухливі.

При проведенні досліджень для контролю використовували м'ясо та гонади свіжоморожених оселедців не інвазованих личинками анізакід, а піддослідними зразками були м'ясо та гонади оселедців свіжоморожених з різним ступенем інвазії анізакідними личинками.

У м'язи і гонади не інвазованих анізакідними личинками свіжо – морожених оселедців (контроль) перед дослідженням вводили штучно дистильовану воду (1 мл): у піддослідних групах: 1 гр. зразків – у м'язи і гонади вводили 3-5 анізакідних личинок, у 2 гр. зразків – більше 5 (від 7 – 20) на 1кг ваги.

Результати досліджень.

Проведеними дослідженнями встановлено що, результати визначення токсичності свіжоморожених оселедців уражених анізакідними личинками мікробіологічним експрес методом з використанням інфузорій *Colpoda Steinii* напряду пов'язані з інтенсивністю інвазії їстівної частини тушки риби.

Таблиця. Токсичність їстівних частин свіжомороженого оселедця в залежності від інтенсивності інвазії анізакідними личинками.

Продукт	Зразки	Тест об'єкт <i>Colpoda Steinii</i> . Життєздатність (годин).		+ - ріст, життєздатні сть інфузорій - - загибель чи відсутність росту інфузорій. Оцінк у токсичності
		10 хвилин	3 години	
Оселедець свіжоморожений неінвазований (контроль)	Ікра	+++++	- +++++	
	Молоки	+++++	+++++	
	М'язи	+++++	+++++	
Оселедець свіжоморожений Зі ступенем інвазії личинками анізакід до 5шт у 1кг риби	Ікра	- +++++	- -++++	
	Молоки	+++++	-+++++	
	М'язи	+++++	+++++	
Оселедець свіжоморожений Зі ступенем інвазії личинками анізакід більше 5шт у 1кг риби	Ікра	- - +++++	- - - ++	
	Молоки	- +++++	- - +++++	
	М'язи	+++++	- +++++	

проводили шляхом виявлення загиблих інфузорій *Colpoda Steinii* чи їх аномального руху в полі зору мікроскопа.

Аналізуючи отримані результати можна твердити, що інфузорія *Colpoda Steinii* у контрольній групі з екстрактом м'язової тканини і молоко оселедця була активна і не мала ніяких аномальних рухів впродовж всього часу дослідження (до 3 годин). У контрольній групі з екстрактом ікри оселедця в ястику інфузорія *Colpoda Steinii* через 10 хвилин після додавання екстракту в культуру тест – об'єкта була активна і не мала патологічних рухів, але вже через 3 години кількість активних форм інфузорій зменшилась десь на 20%, що вказує нам на слабу ступінь токсичності данного продукту. У піддослідних пробах оселедця з низьким ступенем інвазії, де екстракт із ікри і молоко через 10 хвилин кількість інфузорій зменшилась тільки в тій пробі, де екстракт ікри, а через 3 години кількість інфузорій зменшилась в обох пробах – де ікра, десь, на 40%, де молоки – на 20%. В пробі з м'язовою тканиною оселедця з низьким ступенем інвазії змін в кількості і рухливості інфузорій не спостерігалось ні через 10 хвилин, ні через 3 години.

У піддослідних пробах з високим ступенем інвазії, де екстракт з молоко і ікри – зміни в кількості інфузорій були вже через 10 хвилин від початку досліду, де екстракт з м'язової тканини – змін не було. Через 10 хвилин від початку досліду кількість інфузорій зменшилась в пробі з ікрою десь на 60%, з молоками – на 40%, з м'язовою тканиною - десь на 20%.

При порівнянні отриманих результатів I та II піддослідних проб з контролем, можна з впевненістю стверджувати про те, що личинки анізакідних нематод, є токсичними.

Висновки.

1. На підставі отриманих результатів можна стверджувати, що личинки анізакід, що паразитують у риб мають певний ступінь токсичності.
2. Ступінь токсичності анізакідних нематод напряму пов'язаний з інтенсивністю інвазії і локалізацією личинок в їстівних частинах тушки оселедця атлантичного, який проявлявся в зниженні активності, появи патологічних форм і загибелі тест – об'єкту інфузорії *Colpoda Steinii* в піддослідних пробах з екстрактами ікри, молоко, м'язової тканини вище вказаного продукту.
3. Токсико – біологічний експрес – метод визначення токсичності рибної продукції на тест – об'єкті *Colpoda Steinii* виявився дуже чутливим до токсичних речовин, які виділяють анізакідні личинки. Він має дуже велике практичне значення, завдяки простій методиці, високій чутливості до токсинів і є більш прискореним методом, так як вже за 10 хвилин, максимум через 3 години ми можемо зробити висновок про ступінь токсичності піддослідного об'єкту.

Список використаної літератури.

1. Виноходов Д.О., Виноходов В.О. *Colpoda Steinii* как тест – организм. //Инфузорий в биотехнологий. Тезисы. – СПб. 1998. – с.85.
2. Головня Е.А., Большанов Е.Н. Сравнительный анализ токсичности комбикормов на инфузориях родов *Colpoda*, *Stylonychia*, *Paramecium*// Инфузорий в биотестирований. Тезисы. – СПб, 1998. – с. 263.
3. Горохов В.В. Анизакидоз – сложная экологическая проблема. //Ветеринария. – 1999. - №5. – с.7-14.
4. Давидов О.М. Анізакідоз морських риб – ветеринарно – медична проблема. //Здоров'я тварин і ліки. – 2004. - №6. – с. 4-5.
5. Давидов О.М., Кіровська Л.Я., Мандигра М.С. Личинки гельмінтів гідро біонтів, небезпечні для людини і тварини. //Ветеринарна медицина України. – 2004. - №3. – с. 29-31.
6. Давидов О.М., Темніханов Ю.Д., Воловік Г.П. Личинки анізакід морської риби, небезпечні для людини. //Ветеринарна медицина України. – 2003. - №3. – с. 20-22.
7. Джміль В.І. Ветеринарно – санітарна експертиза та оцінка риби при анізакідозі. //Ветеринарна медицина України. – 2000. - №4. – с.36-37.
8. Джміль В.І. Нешкідливість та біологічна цінність м'яса риби, ураженої личинками анізакідних нематод. //Материалы международной научной конференции молодых ученых 31 января – 1 февраля 2000 года «Водные биоресурсы и пути их различного использования» К. 2000. – с.92-93.
9. Достоевський П.П., Давидов О.М., Нікітін П.Д. Анізакідоз риби – це небезпечно. /Ветеринарна медицина України. – 1996. - №4. – с.26-27.
10. Ковбасенко В.М., Горобей О.М., Лешкевич О.А. Експрес – метод визначення токсичності продуктів тваринництва з використанням інфузорій *Colpoda Steinii*. //Аграрний вісник Причорномор'я. Одеса. 2002. с. 51-55.
11. Методичні рекомендації визначення токсичності продуктів тваринництва і кормів (мікробіологічний експрес – метод). За редакцією В.М. Ковбасенко. – Київ. 2002. – с.17.
12. Микитюк П.В. Анізакідоз морських та океанських риб. //Ветеринарна медицина України. – 1996. - №6. – с. 30-31.
13. Микитюк П.В. Микрометод токсико-биологической оценки рыбы и других гидробионтов: Метод рекоменд. /Бел. СХИ; П.В. Микитюк. – Киев. 1987. – 21с.
14. Розум Е.Ю. Санитарная оценка хищных рыб при заболеваний анизакидозом во внутренних водоёмах северо – западного Причорномор'я. «Исследования в области ветеринарии». Мат. меж вуз. конф. Одеса. – 1994. – с.48.

Экспресс - метод определения токсичности промысловой рыбы пораженной личинками анизакид с использованием инфузории *Colpoda Steinii*.

Е.Ю. Розум, О.В. Онищенко

*Проведенными исследованиями установлено, что определение токсичности промысловой рыбы, пораженной личинками анизакид, микробиологическим методом с использованием инфузории *Colpoda Steinii* [10] по достоверности не отличается от исследований на лабораторных животных (белые мыши) и поэтому мы предлагаем его для использования в лабораториях ветеринарно - санитарной экспертизы на рынках. Предлагаемый микробиологический метод определения токсичности рыбы легко выполняется в производственных условиях и дает возможность получить результаты исследований за 10мин – 3ч.*

Express toxicity test of the fish obtained from fisheries and infected with anyzakid larvae using *Colpoda Steinii* infusoria.

E.U. Rozum, O.V. Onishenko.

Reliability of toxicity determination of the the fish obtained from fisheries and infected with anyzakid larvae by application of *Colpoda Steinii* infusoria, as defined by studies conducted does not differ from laboratory animal (white mice) test, which allows us to introduce this test for application in veterinary – sanitary laboratorial on trade markets. The microbiological toxicity test is easily performable during fish processing and allows to obtained results within 10 min – 3 hrs.

Аграрний вісник Причорномор'я. Ветеринарні науки. – Одеса, 2005. - Вип. 30. - С.23-28 (ВАК України 09.06.99).