

МИНИСТЕРСТВО  
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
Утверждаю  
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ  
руководителя  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ветеринарии  
(Минсельхозпрод России)  
В.В.Селиверстов

Заместитель  
Департамента

07.10.99г. № 13-4-2/1755

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ  
по диагностике алиментарных токсикозов у рыб

1. Общие положения

Алиментарные токсикозы рыб вызываются веществами различной природы, которые попадают в комбикорма с сырьем или образуются в процессе неправильного хранения корма. Токсический эффект проявляется как в гибели рыб, так и в различных патологических отклонениях в их физиологическом состоянии.

Диагностика алиментарных токсикозов состоит из трех этапов: 1 - обследование рыбы (с целью выявления глубины токсикоза), 2 - исследование корма и определение степени его токсичности, 3 - обнаружение и количественное определение токсического агента.

2. Обследование рыбы

Алиментарные токсикозы рыб проявляются, в зависимости от дозы и кратности поступления токсиканта, в острой и хронической формах. Высокие дозы токсиканта вызывают острые токсикозы, сопровождающиеся массовой гибелью рыб. При низких дозах интоксикация сопровождается по истечении определенного срока (около 30-40 дней) нарушением обменных процессов, замедлением роста, снижением резистентности и даже гибелью наиболее ослабленных экземпляров рыб.

2.1. Острые токсикозы вызываются дозами, значительно превышающими МДУ (максимально допустимые уровни), и приводят к быстрой гибели рыб в течение 1-3 суток. В зависимости от вида токсиканта клинические признаки могут быть самыми разными, но, как правило, поражаются нервная, опорно-двигательная или кровеносная системы.

2.2. Хронические токсикозы проявляются поэтапно. Их проявление сходно с симптомами, наблюдаемыми при неполноценном или несбалансированном кормлении. Болезнь имеет несколько стадий развития.

I стадия. Видимых клинических признаков заболевания не обнаруживается. Отмечают отклонение показателей обмена веществ от нормы, что проявляется в снижении темпа роста, а иногда в форме катарального воспаления кишечника.

II стадия. Длительное скармливание недоброкачественных кормов приводит к снижению естественной неспецифической резистентности рыб, изменению гематологических показателей, воспалению ануса, различных отделов кишечника и выделению слизистых тяжей вместе с экскрементами.

III стадия. При длительном потреблении слаботоксичных кормов болезнь приобретает хроническую форму. При внешнем осмотре рыб выявляют дряблость мышц, симптом "острой спины", изменение окраски тела и плавников, язвы и кровоизлияния различной локализации, опухоли. При патологоанатомическом вскрытии отмечают ожирение печени, гидронефроз почек, увеличение их объема, наличие опухолей, асцит, энтерит. Хронические токсикозы приводят к снижению воспроизводительной функции, появлению физиологически неполноценного потомства, снижению резистентности. В отдельных случаях рыбы могут сохранять нормальные показатели темпа роста.

2.3. Для диагностики алиментарных токсикозов исследованию подвергают по 10 рыб из каждой группы. Рыбы исследуемой группы считаются больными, если выявлено не менее 20 % рыб с нарушением обмена веществ. Диагноз устанавливают по среднегрупповым значениям показателей в выборке, а по индивидуальным - с учетом симптоматики заболевших рыб.

2.4. Для диагностики стадии течения токсикозов используют различные физиолого-биохимические методы. Для выявления нарушений используют не менее 5-10 физиолого-биохимических показателей (белок, остаточный азот, азот аминокислот, мочевины, липиды, холестерин, глюкоза, мочевая кислота, аспартатаминотрансфераза, холинэстераза сыворотки крови и др.). На этой стадии заболевание диагностируют гематологическими методами, подробно изложенными в "Методических указаниях по проведению гематологического обследования рыб", утвержденных Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России 02.02.99 г., № 13-4-2/1487. Степень патологических отклонений определяется гистологическими методами.

2.5. Любой токсический агент, содержащийся в комбикормах, может вызывать

неспецифическую реакцию организма рыб: повышение содержания глюкозы в крови, снижение содержания белка и гидремию, увеличение содержания гликогена в печени. Картина крови характеризуется микроцитарной базофильной или полихроматофильной анемией.

2.6. Одновременно с неспецифической реакцией каждый из алиментарных факторов вызывает заболевание рыб, отражающееся в специфическом изменении обменных процессов. Характер изменений физиолого-биохимических показателей обмена веществ и клинические признаки у рыб при токсикозах, вызванных некоторыми распространенными алиментарными факторами, приведен в приложении 1.

### 3.3. Исследование корма.

Качество кормов оценивают на общую токсичность по выживаемости тест-объектов. При выявлении их токсичности специальными методами определяют наличие в них окисленных жиров, микотоксинов, тяжелых металлов, пестицидов и других загрязнителей (Санитария кормов: справочник, 1991).

### 3.1. Максимально допустимые уровни (МДУ) содержания патогенных факторов в комбикормах

3.1.1. Для карпа (от сеголетков до товарной рыбы) МДУ на продукты окисленных жиров разработаны для хозяйств с низкой естественной кормовой базой. Для всех возрастов карпа недопустимо превышение:

- кислотного числа: 50 мг КОН в 1 г жира;
- перекисного числа: 1,0 % йода;
- альдегидного числа: 1,0 Е г/100 мл/см (в единицах оптической плотности). МДУ

микотоксинов:

- Т-2-токсин: 0,05 мг/кг корма,
- DON-токсин: 3,33 мг/кг корма.

Суммарное содержание продуктов микробиосинтеза: паприна (БВК, дрожжи на нефтепарафинах), гаприна (БВК, дрожжи на природном газе), гиприна (гидролизные, кормовые дрожжи) - 5 % массы корма,

### 3.1.2. Для лососевых рыб

МДУ на афлатоксины не разработаны

- радужная форель наиболее чувствительна к афлатоксинам;
- афлатоксин В1 (0,03 - 0,06 мг/кг корма) вызывает массовую гибель мальков;
- концентрации 0,5-1,0 мг/кг корма вызывают образование опухоли печени;
- афлатоксины В2, G1 и G2 встречаются в кормах реже и в меньших концентрациях, чем афлатоксин В1 они также уступают ему в токсичности и канцерогенности;

МДУ на госсипол для рыб не разработаны

- доза 0,1 г/кг - вызывает изменения гематологических показателей и нарушает процесс синтеза белка;  
доза 0,3 г госсипола на 1 кг корма подавляет рост рыб.

3.2. Определение токсичности фуражного зерна, продуктов его переработки и комбикормов с использованием рыб-группы. При санитарной оценке концентрированных кормов их необходимо исследовать на токсичность, которая может быть обусловлена за счет наличия в кормах химических соединений и микотоксинов. Для этой цели в соответствии с ГОСТ отбирают средние пробы кормов и отправляют в лабораторию на исследование, при котором определяют общую токсичность и присутствие микотоксинов.

#### 3.2.1. Определение общей токсичности.

Исследования проводят по Методике, утвержденной ГУВ МСХ СССР 04.06.1980г. Принцип

методики основан на извлечении из фуражного зерна, продуктов его переработки, комбикормов ацетоном жиро- и водорастворимых фракций токсических веществ и последующем воздействии этих фракций на аквариумных рыб-группы.

Методика позволяет определить токсичность концентрированных кормов в течение суток без учета времени подготовки образцов для тестирования.

Пробу фуражного зерна (ячмень, овес, пшеница, горох, кукуруза, просо) 50 г тщательно измельчают на лабораторной мельнице (отруби и комбикорма экстрагируют без измельчения), помещают в плоскодонную колбу с притертой пробкой, заливают 150 мл ацетона и экстрагируют при встряхивании на шуттель-аппарате в течение двух часов.

Экстракт фильтруют через бумажный фильтр в фарфоровую чашу и выпаривают под тягой на водяной бане ( $T$  55-60°) досуха. Сухой остаток растворяют в 5 мл ацетона и переносят его в химический стакан (емкостью 700-800 мл, диаметром 11-15 см) с 500 мл воды из аквариума комнатной температуры (17-20°). Экстракты из комбикормов, кукурузы, гороха и проса после растворения в воде помещают в бытовой холодильник на 40-45 мин. при  $T$  6-7°С, по истечении срока экстракты фильтруют через небольшой слой ваты, подогревают до исходной температуры (17-20°). В воду с экстрактом помещают 5 рыб-группы независимо от пола, возраста, за которыми ведут наблюдение, отмечая их гибель через 24 часа (группы, вышедшие из опыта, выбраковываются),  
Примечание. Если фуражное зерно, продукты его переработки и комбикорм окажутся

токсичными, такие партии кормов немедленно исключаются из рациона и проводят дополнительные дифференциальные исследования на хлор- и фосфорорганические соединения, препараты ртути, алкалоиды (по ранее разработанным методикам) и микотоксины.

### 3.2.2. Определение микотоксинов.

Методика основана на извлечении микотоксинов из фуражного зерна, продуктов его переработки комбикормов, частичной очистки экстракта гексаном от липидов и некоторых неполярных хлор- и фосфорорганических соединений с последующей перегонкой микотоксинов хлороформом и исследованием на рыбах-гуппи. Методика позволяет определить токсичность в течение 24-30 часов.

Пробу фуражного зерна 50 г тщательно измельчают на лабораторной мельнице (отруби и комбикорма экстрагируют без измельчения), помещают в плоскодонную колбу с притертой пробкой, заливают 150 мл ацетона и экстрагируют при встряхивании на шуттель-аппарате в течение двух часов или в статическом состоянии - 20 часов. Экстракт фильтруют через бумажный обеззоленный фильтр в фарфоровую чашку и упаривают под тягой на водяной бане (55-60°) до объема 45-50 мл. Остаток переносят в делительную воронку, в которую добавляют 10 мл воды. Содержимое чашки смывают 5 мл ацетона, сливают в делительную воронку и встряхивают одну минуту. Затем в воронку вносят 50 мл гексана и встряхивают 1-2 минуты. После разделения слоев - нижний сливают в другую делительную воронку и дважды экстрагируют 40 мл хлороформа (в каждом случае встряхивают две минуты). Гексановую фракцию, при необходимости, исследуют на хлор и фосфорорганические соединения. После разделения слоев хлороформные фракции (нижний слой) сливают в фарфоровую чашку и упаривают под тягой на водяной бане (55-60°) до исчезновения хлороформа (досуха). Сухой остаток растворяется 5 мл ацетона и переносят его в химический стакан с 500 мл воды (17-20°), взятой из аквариума. В раствор экстракта помещают пять гуппи независимо от пола и возраста, за которыми ведут наблюдение, отмечая их гибель через 24 часа. Для повышения биологической достоверности результатов численность тест-организмов необходимо увеличить до 10 штук, то есть проводить биоанализ в двух повторностях.

### 3.2.3. Результаты определения.

В зависимости от степени токсичности исследуемого корма гуппи погибают в сроки, указанные в таблице 1.

Таблица 1.

## Оценка степени токсичности исследуемого корма

---

Степень токсичности кормов	Количество погибших группы, экз.	Время гибели, (в часах)
Нетоксичный	Не более 1	В течение 24 час.
Слаботоксичный	2-4	- " -
Токсичный	5	- " -

---

### 3.3. Определение токсичности кормов с использованием инфузории Тетрахимена пириформис

Исследования проводят в соответствии с «Методическими рекомендациями по биологической оценке продуктов животноводства и кормов с использованием тест-объектов тетрахимена пириформис», М., ВАСХНИЛ, 1977 г. (М., Колос, 1978 г.). Работу проводят следующим образом.

Взятые на анализ пробы кормов тщательно перемешивают и растирают в ступке. Берут ряд навесок (не меньше 3 - 5) в количествах, обратно пропорциональных предполагаемой токсичности, но не более 300 мг в наибольшей по массе навеске. Их вносят в пробирки или флаконы и заливают по 2 мл чистой кипяченой воды, закрывают резиновыми пробками с вырезкой для доступа воздуха, что предотвращает выбрасывание пробок при нагревании флаконов. Прогревают в водяной бане (или стерилизаторе) 15-20 мин. при температуре 80-90°C. После охлаждения до комнатной температуры во флаконы вносят по 0,05 мл культуры Тетрахимены пириформис, разведенной перед этим водой в 10 раз, и ставят в термостат при +25°C или в обычный шкаф в затемненное место при комнатной температуре на 1-4 суток.

Наличие роста, его степень контролируют каждые сутки под микроскопом (МБС - микробиологический стереоскопический) при увеличении 2x8. Это позволяет просматривать пробы прямо в пробирке или флакончике, не беря их пипеткой, что является предварительным контролем, за которым следует просмотр в капле под МБИ (увеличение 7x90). Каплю берут на предметное стекло пастеровской пипеткой или стеклянной палочкой, просматривают весь объем, все слои. Контролем является водопроводная, дехлорированная путем кипячения вода, в которую одновременно с опытом также засевают культуру инфузорий.

Угнетение подвижности, наличие гибели, даже единичных особей или их деформации

свидетельствует о токсичности или другой вредности исследуемого материала. Определенную вредность продукта характеризует замедление роста и размножения инфузорий. Для этого на 4-е сутки производят количественный учет выросших особей в счетной камере Фукс-Розенталя или Горяева, но чаще всего ограничиваются примерным учетом погибших особей путем просмотра капли среды в трехкратной повторности, наличием каких-либо отклонений в подвижности и внешнем виде инфузорий. В совокупности эти наблюдения позволяют сделать вывод о степени токсичности исследуемого корма (продукта) и охарактеризовать ее в баллах:

Таблица 2

Балл	Оценка токсичности корма, продукта	Результаты наблюдений		
		рост	гибель клеток	другие изменения
1	Нетоксичный	Густой	Нет	Нет
2	Слаботоксичный	Несколько угнетен	Нет	Возможны
3	Умеренно токсичный	Сильно угнетен	Нет	Возможны
4	Токсичный	Очень сильно угнетен	Часть погибла	Возможны
5	Сильно токсичный	-	Полная гибель клеток	-

Целесообразно делать и подсчет выросших особей. Для этого во все флаконы вносят по 3 мл фиксирующего раствора, например, формалина, приготовленного по следующей прописи: 20 мл 33% формалина, 175 мг  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 170 мг  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  и 440 мл дистиллированной воды.

Количество инфузорий в каждом флаконе, соответствующем разведению (титру) корма, выражают в процентном отношении к контролю (засеянному на стандартную среду, разведенную водой в 10 раз) и выдержанному в то же самое время, что и опыт. На основании полученных цифр проводят соответствующие расчеты угнетения роста и гибели по правилам общей токсикологии. При необходимости используют и полулогарифмическую сетку пробит-анализа.

Кроме того, пробы, не показавшие гибели или других патологических изменений  
Тетрахимены в течение 1-4 суток, оставляют на дальнейшую инкубацию до 7 суток для выявления  
возможной кумуляции, т.е. накопления токсического эффекта,  
характеризующегося замедлением  
развития, частичной гибелью и другими изменениями жизнедеятельности  
данного тест-объекта. Их  
наличие также выражают в баллах или в процентах от количества особей в  
опыте и по отношению к  
контролю.

Культурная стандартная среда для тетрахимены пириформис: 2 г пептона  
бактериологического; 0,5 г глюкозы; 0,1 г дрожжевого экстракта; 0,1 г  
морской соли аптечной (или  
0,1 г NaCl) на 100 мл дистиллированной воды. Среду подвергают  
автоклавированию при 0,5 атм. 30  
мин. или в кипящей водяной бане 1 час. Хранят в темном месте, т.к. на  
свету питательные  
компоненты разлагаются. Слой среды не должен превышать 1,5-2 см.  
Культуру поддерживают  
путем пересева каждые 7-10 суток на новую среду.

3.4. Экспресс-метод определения общей токсичности фуражного зерна,  
продуктов его переработки и комбикормов с использованием инфузорий  
стилонихий.

Биологический экспресс-метод определения токсичности введен с 1 января  
1993 г. в ГОСТ  
13496.7-92 "Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма.  
Методы определения  
токсичности" и ГОСТ 29136-91 "Мука кормовая из рыбы, морских  
млекопитающих, ракообразных и  
беспозвоночных. Методы определения токсичности".

Экспресс-метод основан на качественном и количественном определении  
реакции инфузорий  
стилонихий на действие различных фракций токсических веществ  
(бактериальной, грибковой и  
химической природы), извлекаемых ацетоном из исследуемого продукта,  
совместно с действием  
мелкодисперсной взвеси продукта, находящейся в его водно-ацетоновом  
растворе. Токсический  
эффект оценивается через 1 час, при этом одновременно проводятся  
качественный и  
количественный анализ. В первую очередь осуществляется качественный  
анализ. Визуально, с  
помощью микроскопа МБС-10 (увеличение 2x8), оценивается подвижность  
инфузорий во всех  
тестируемых пробах (комбикорма или их компоненты). При отсутствии  
токсичности инфузории  
подвижны. В токсичных пробах инфузории неподвижны. Далее проводят  
количественный анализ в  
пробах с неподвижными инфузориями. В этом случае токсический эффект  
оценивается по проценту  
гибели инфузорий, который пропорционален степени токсичности  
продукта. Погибшие организмы

полностью распадаются (лизировются), что облегчает количественный подсчет выживших организмов.

3.4.1. Определение общей токсичности на инфузориях стилонихиях визуальным методом.

3.4.1.1. Необходимое оборудование и материал

Для осуществления метода экспрессного биотестирования требуется следующее оборудование:

1. Микроскоп бинокулярный стереоскопический.
2. Весы лабораторные 4 класса.
3. Мельница электрическая лабораторная.
4. Шкаф сушильный.
5. Планшетка с 50 лунками 1шт.
6. Колбы конические для экстракции емкостью 100мл - 15шт. 7-Химические стаканы емкостью 100мл - 15шт.
8. Шприц многоразовый с дел. на 0.5мл-1шт.
9. Пипетки мерные Мора на 25мл, 20мл и 15мл - по 1шт.
10. Цилиндр мерный на 100 мл - 1 шт.
11. Часы песочные на 2 мин.- 1шт.
12. Пипетки для пересадки инфузорий - 50шт.
13. Чашки Петри - 30шт.
14. Дрожжи пекарские прессованные (ГОСТ 171-81) - 50г.
15. Бумага фильтровальная.
16. Карандаш по стеклу.
17. Ацетон марки ЧДА, ОСЧ - 1,5л на 100 анализов
18. Спирт этиловый 1,75л на 100 анализов + 100мл на каждые 100 пересевов культуры.
19. Сито с ячейей 0,5мм.

3.4.1.2. Подготовка пробы к биотестированию

Пробу кормовой муки, сырья и комбикормов в количестве немногим более 10г (1 столовая ложка) измельчают на лабораторной электрической мельнице в течение 1-2х минут и просеивают через сито с ячейей 0,5 мм. Навеску пробы (10г) помещают в стеклянную посуду для экстракции емкостью 100 мл с притертой пробкой (можно использовать баночки из-под детского питания на 100 г с крышкой), заливают 15мл ацетона и экстрагируют при энергичном встряхивании в течении 2-х минут. Экстракту дают отстояться в течение 10 минут, после чего прозрачный надосадочный экстракт в количестве 0,5мл осторожно отбирают шприцем и переносят в химический стакан со средой для культивирования инфузорий, объем которой указан в таблице 3.

Приготовленные водные растворы ацетоновых экстрактов мясокостной и рыбной муки, дрожжей гидролизных, БВК, и жиросодержащих продуктов (кукуруза, шроты) перед проведением биотестирования необходимо профильтровать через слой фильтровальной бумаги.

а 3.

Приготовление водного раствора ацетонового экстракта кормовой муки,

сырья и комбикормов

№№	Вид продукта	Навеска пробы г	Кол-во ацетона мл	Кол-во ацет. экстракта мл	Кол-во воды мл
1	Комбикорма для садкового рыбоводства, карповые	10	15	0,5	50
2	Комбикорма для свиноводства и птицеводства		15		40
3	Зернофураж и продукты его переработки		15		40
4	Шроты		15		40
5	Мука травяная		20		40
6	Мука рыбная, крилевая, мясокостная		15		80
7	Мука кровяная (альбумин)		15		50
8	Молоко сухое		15		80
9	Дрожжи гидролизные		15		45
10	Белотин		20		50
11	Контроль		0,5		50

#### 3.4.1.3. Подготовка тест-организмов для биотестирования.

В качестве тест-объекта используется инфузория стилонихия *Infusoria stilonichia mutilus*

(Ehrenberg), относящаяся по систематике Догеля к классу Infusoria, подклассу Ciliata, отряду Spirotricha, подотряду Hipotricha.

Для биотестирования используется клонально-смешанная культура, которая постоянно

поддерживается в отделе МКЦП "Марикультура" Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО).

Для биотестирования используют суточную культуру инфузорий. Для этого инфузорий за

сутки до постановки опыта из нескольких резервных чашек Петри пересаживают в большом

количестве (200-500 экз.) в чашку Петри с новой средой и культивируют при температуре

24-26 °С с добавлением корма (на 25 мл среды 1 кусочек сухих пекарских дрожжей размером

с маковое зернышко, т.е. весом около 0,003 г), при этом инфузории концентрируются

вокруг корма.

#### 3.4.1.4. Проведение биотестирования

Испытания начинают с отбора пипеткой тест-организмов, сконцентрированных вокруг корма

в чашке Петри, и внесения их в каждую лунку планшетки по одной капле, при этом в лунку попадает около 20 шт. инфузорий. Биотестирование проводят в лунках с рабочим объемом 0,4 мл, высверленных и отполированных в пластине из оргстекла (10 рядов по 5 шт. в каждом). Для тестирования одной пробы используют 5 повторностей (5 лунок). При пересадке инфузорий пользуются одной пипеткой (культуральной), а при внесении в лунки подготовленной для тестирования пробы пользуются другой пипеткой (для опыта). Регистрация тест-организмов осуществляется визуально с помощью микроскопа бинокулярного в лунках, которые полностью попадают в поле зрения микроскопа при увеличении 2x8.

Через 1 час после внесения пробы в случае токсичности комбикорма (сырья), происходит гибель инфузорий, величина которой зависит от степени токсичности комбикорма. Погибшие организмы полностью лизируются, в результате чего облегчается проведение количественного подсчета выживших инфузорий.

Порядок проведения испытания следующий:

- инфузорий под бинокуляром в массе отбирают культуральной пипеткой из чашки Петри, где они сконцентрированы вокруг корма, и по одной капле помещают в каждую из пяти лунок планшетки, при этом в каждую каплю попадает примерно от 10 до 20 шт. инфузорий (это количество используют в опыте);
- просматривают под бинокуляром количество инфузорий в каждой лунке планшетки и, если их слишком много в одной и недостает в других, то инфузорий более-менее равномерно распределяют в лунки планшеток той же пипеткой;
- после распределения инфузорий для их обездвиживания в каждую лунку планшетки вносят другой пипеткой по 2 капли приготовленной для биотестирования пробы, удаляя жир с пипетки сухой ватой;
- через 5 минут подсчитывают инфузорий в каждой лунке планшетки и заносят их количество в журнал;
- после подсчета инфузорий в лунки планшетки (до 1/2 их объема) вносят этой же пипеткой приготовленную для биотестирования пробу, также вытирая пипетку от жира ватой, и регистрируют время в журнале;
- через 1 час экспозиции вторично подсчитывают количество инфузорий;
- рассчитывают численность инфузорий через 1 час экспозиции в % от числа посаженных по формуле:

$$N = \frac{N_2 \times 100\%}{N_1}, \text{ где}$$

N1

N1 - общая численность посадки инфузорий

N2 - общая численность инфузорий через 1 час экспозиции.

#### 3.4.1.5. Анализ результатов

Степень токсичности исследуемого корма оценивается через 1 час по количеству выживших инфузорий в % от численности их посадки в соответствии со шкалой, указанной в таблице 4. В качестве контроля используют однопроцентный водный раствор ацетона, в котором инфузории в течение 1 часа должны остаться живыми. Контроль ставится с целью определения качества ацетона и среды.

Таблица 4

Оценка степени токсичности исследуемого корма

Степень токсичности	Выживаемость инфузорий в % от посадки через 1 час опыта ( N )
Нетоксичный	100-81
Слаботоксичный	80-50
Токсичный	49-0

#### 3.4.1.6. Культивирование инфузорий стилонихий

Культивируют стилонихий в закрытых чашках Петри на среде Лозина-Лозинского (см. ниже); в качестве корма используют сухие пекарские дрожжи, которые добавляют в среду во время пересева культуры. При проведении большого числа анализов (более 10 ежедневно), а также в зимний период (особенно в феврале -марте) необходимо одновременно культивировать не менее 8 чашек с инфузориями, поддерживая оптимальную температуру 24-26° С. Помещение для работы с инфузориями должно быть изолировано от химической лаборатории, воздух не должен содержать никаких вредных паров и химических примесей.

Недопустимо попадание прямых солнечных лучей на чашки Петри с культурой инфузорий.

Подготовка корма. Корм для инфузорий - сухие пекарские дрожжи, которые готовят следующим образом. Свежие прессованные дрожжи (брикет 100 г) измельчают и высушивают в течение 1 недели, закрывая от пыли бумагой, при комнатной температуре, после чего хранят в баночке с притертой крышкой. Срок хранения сухих дрожжей -12 месяцев.

Среда культивирования. Для культивирования инфузорий используют среду Лозина-

Лозинского, которую готовят на дистиллированной воде с добавлением следующих солей (г/л):

NaCl - 0,1; KCl - 0,01; NaHCO<sub>3</sub> - 0,02; MgSO<sub>4</sub> - 0,01; CaCl<sub>2</sub> - 0,01.

Пересев культуры. Пересев культуры производят каждый раз за сутки до постановки опыта.

Если экспериментальная работа не проводится, то культуру инфузорий пересаживают не менее 2-х раз в неделю в зависимости от температуры.

Перед добавлением корма пальцы рук и пинцет необходимо протереть спиртом.

Пересев культуры инфузорий из нескольких резервных чашек (обычно 4) в новую чашку Петри осуществляют пипеткой, при этом кончик пипетки должен быть полностью погружен в среду. После пересева чашку Петри ставят на место, где проводят культивирование и только после этого добавляют корм (на 25мл среды - 1 кусочек сухих пекарских дрожжей размером с маковое зернышко).

Передозировка корма недопустима, поскольку она может привести к угнетению инфузорий или их полному исчезновению. При передозировке вокруг корма через сутки образуется облачко молочного цвета, которое необходимо убрать пипеткой, что несколько улучшит состояние культуры инфузорий.

После добавления корма чашку Петри с культурой не трогают в течение 4-х часов для получения концентрированной культуры инфузорий.

После пересадки культуры на крышке чашки Петри карандашом по стеклу ставят дату пересева. При отборе инфузорий из резервных чашек (во время пересева) сливают большую часть старой среды, доливают свежей среды до половины объема чашки и добавляют корм. Таким образом, эти чашки можно использовать несколько раз для дальнейшего пересева инфузорий.

Требования к посуде. Лабораторная посуда должна использоваться только для работы с инфузориями. Подготавливают ее следующим образом: Чашки Петри, химические стаканы, шприц, посуду для экстракции комбикормов или сырья моют раствором стирального порошка или мыльным раствором и ополаскивают проточной водой (после стирального порошка не менее 6 раз).

Планшеты моют только мыльной пеной, используя боковую поверхность пробирочного ерша, ополаскивают водой, а затем чистоту лунок проверяют под микроскопом МБС-10 (увеличение 2х8).

После биотестирования жиросодержащих продуктов (мука рыбная или мясокостная, шроты, жмыхи, кукуруза и проч.) дно лунок может быть покрыто белым налетом, который удаляют обильно намоченной ватой.

Планшеты после мытья сушат только на воздухе. Чашки Петри и пипетки прокаливают в сушильном шкафу в течение 1 часа при температуре не менее 110° С. Хранят посуду в защищенном от пыли месте.

Транспортировка культур. Транспортируют культуру инфузорий в герметично закрытых банках емкостью 100мл. Баночку наполовину заливают средой, пересаживают культуру инфузорий, добавляют корм и закрывают, проверив на герметичность. Чтобы не допустить перегрева или охлаждения ее помещают в банку большего объема, обкладывают со всех сторон бумагой и закрывают крышкой. Зимой банку снаружи обертывают газетой в три слоя и помещают в полиэтиленовый пакет. В такой упаковке культура инфузорий в закрытом виде может храниться одну неделю.

Начиная работу на новом месте, необходимо прежде всего нарастить достаточную биомассу инфузорий не менее, чем в 4-х чашках Петри.

#### 3.4.2. Определение общей токсичности на инфузориях с помощью автобиоанализатора

Автобиоанализатор - комплексное устройство, сочетающее биологический экспрессный метод и компьютерный анализ. Автобиоанализатор осуществляет подсчет живых инфузорий и оценку степени токсичности в автоматическом режиме, при этом, в отличие от визуального метода, в качестве показателя токсичности используется более чувствительная, чем выживаемость, тест-функция - снижение двигательной активности инфузорий стилонихий. Использование прибора позволяет автоматизировать самую трудоемкую часть работы при биотестировании экспресс-методом, исключить фактор субъективности при подсчете количества инфузорий. Рекомендуется использовать на предприятиях, где количество проб в день составляет больше пяти.

##### 3.4.2.1. Необходимое оборудование и материалы Для осуществления автоматизированного метода экспрессного биотестирования требуется следующее оборудование:

1. Автобиоанализатор
2. Микроскоп бинокулярный стереоскопический.
3. Весы лабораторные 4 класса.
4. Мельница электрическая лабораторная.
5. Шкаф сушильный.

- 6.Круглая планшетка с 16 лунками 1шт.
- 7.Колбы конические для экстракции емкостью 100мл - 15шт.
- 8.Химические стаканы емкостью 100 мл - 15шт.
- 9.Шприц многоразовый с дел. на 0.5 мл-1шт.
- 10.Пипетки мерные Мора на 25мл, 20 мл и 15мл - по 1шт.
- 11.Цилиндр мерный на 100 мл - 1 шт.
- 12.Часы песочные на 2 мин.- 1шт.
- 13.Пипетки для пересадки инфузорий - 50шт.
- 14.Чашки Петри - 30шт.
- 15.Дрожжи пекарские прессованные (ГОСТ 171-81) - 50г.
- 16.Бумага фильтровальная.
- 17-Карандаш по стеклу.
- 18.Ацетон (марки ЧДА,ХЧ,ОСЧ) - 1,5л на 100 анализов.
- 19.Спирт этиловый 1,75л на 100 анализов + 100мл на каждые 100 пересевов культуры.
- 20.Сито с ячейей 0,5мм.

#### 3.4.2.2.Характеристика автобиоанализатора

В состав автобиоанализатора входят: компьютер IBM/PC-486, биодетектор, подсистема позиционирования, программный комплекс анализа токсичности.

Биодетектор - устройство преобразования оптического изображения лунки с инфузориями в аналоговой телевизионный сигнал, состоит из оптической и электронной подсистемы.

Оптическая подсистема обеспечивает надежную видимость объекта размером 200 - 250 мк (инфузория стилонихия) и захват в поле зрения телекамеры всей лунки микроаквариума диаметром 14 мм и глубиной 6 мм.

Электронная часть представлена видеокамерой и интерфейсной платой ввода и оцифровки

изображения в компьютер и управления шаговым двигателем -подсистема позиционирования.

Подсистема позиционирования планшетки с микроаквариумами состоит из контроллера

перемещения, механического устройства и программного драйвера. Драйвер осуществляет

управление контроллером перемещения и обеспечивает связь между программой ввода и обработки

изображения и контроллером. При включении программы подсистема позиционирования

устанавливает планшетку в начальное положение, и лунка N 1 круглой планшетки попадает в поле

зрения объектива телекамеры. Положение первой лунки определяет герконовый контакт, который

срабатывает, когда платформа с планшеткой переместится до начального положения (на платформе

в этом месте закреплен магнит). В дальнейшем, при включении команды "Шаг" (с помощью

клавиатуры или мыши) или в режиме полного автоматического определения токсичности, система

позиционирования передвигает планшетку на каждую следующую позицию.

Механическая часть

системы позиционирования, состоящая из шагового двигателя, редуктора и платформы, обеспечивает позиционирование планшетки с точностью 3%.

Программа обеспечивает: удобную настройку системы; определение степени токсичности

одного или нескольких образцов в заданном числе лунок; ввод и редактирование необходимой дополнительной информации; запись полученных результатов на диск и чтение их с диска; распечатку полученных результатов на принтере.

3.4.2.3. Требования к условиям анализа и параметрам программы

- температура в лунке в момент измерения должна поддерживаться на уровне 24 - 26 ° С.
- время экспозиции инфузорий в лунке после их пересадки из чашки Петри перед первым подсчетом составляет не менее 15 мин. и зависит от установления оптимальной температуры и чистоты лунки.
- для работы используется только суточная культура инфузорий. Культура более старшего возраста (2-3 суточная) характеризуется нестабильной реакцией на токсические вещества и более высокой устойчивостью к ним;
- для создания оптимальных оптических условий следует обеспечить тщательную полировку лунки и выбор такого объема в раствора, чтобы его уровень в лунке не превышал 4 мм, что достигается при внесении в лунку 6-7 капель раствора;
- освещение лунки обеспечивается люминесцентной лампой. Основным критерий правильности выбора освещенности - исключение зон засветки и затемнения в изображенной на мониторе картинке лунки со средой;
- оптимальная плотность инфузорий - в пределах 50-70 клеток в лунке;
- особенно строгое требование предъявляется к чистоте лунки, критерием которой служит отсутствие в контроле подавления активности инфузорий через 1 час после первого подсчета (первый подсчет производится через 20-30 мин. после посадки инфузорий в лунку)

3.4.2.4. Подготовка пробы к биотестированию см. п. 3.4.1.2.

3.4.2.5. Подготовка тест-организмов для биотестирования см. п. 3.4.1.3.

3.4.2.6. Внесение тест-организмов.

Испытания начинают с отбора пипеткой тест-организмов, сконцентрированных вокруг корма в чашке Петри, и внесения их в каждую лунку планшетки по три капли; при этом в лунку попадает около 50 шт. инфузорий. Для тестирования одной пробы используют две повторности (2 лунки заполняют экстрактом одного продукта). Всего в планшетке - 16 лунок, таким образом, одновременно может быть протестировано 7 проб исследуемых продуктов, а 2 лунки используются для контроля.

При пересадке инфузорий пользуются одной пипеткой (культуральной), а при внесении в лунки подготовленной пробы пользуются другой пипеткой (опытной). Диаметр капиллярного отверстия пипетки должен быть калиброван и составлять  $250 \pm 1$  мкм.

В качестве контроля используют 1% раствор ацетона, в котором инфузории в течение 1 часа должны оставаться живыми. Контроль ставится с целью определения качества ацетона и среды для культивирования инфузорий.

3.4.2.7. Подсчет количества тест-организмов с помощью автобиоанализатора.

За 10 - 15 мин. до установки на платформу планшетки с внесенными в лунки инфузориями необходимо включить лампу подсветки для подогрева платформы до  $24-26^{\circ}\text{C}$ , т.е. температуры культивирования. В противном случае активность инфузорий и, соответственно, результаты подсчета будут изменяться в зависимости от колебания температуры.

Первоначальный подсчет ("первое измерение") инфузорий начинают через 30 мин. после установки планшетки на платформу с целью выравнивания их температур. На штативе вблизи платформы устанавливают термометр для контроля температуры и исключения ее колебания в зоне проведения измерений.

Подсчет осуществляется в соответствии с алгоритмом:

1. Включить компьютер.
2. Включить переключатель авторегистратора.
3. Поместить планшетку на платформу авторегистратора.
4. В режиме "Настройка/ живое видео" проверить качество изображения; подстройка резкости изображения производится поворотом объектива.
5. В автоматическом режиме запустить программный модуль подсчета тест-организмов.
6. По окончании подсчета включить переключатель авторегистратора.

3.4.2.8. Внесение пробы

Пипеткой, используемой в опыте, водный раствор тестируемого продукта вносят в лунки планшетки (экстракт одного продукта - в 2 лунки) в количестве 4 капель, не касаясь кончиком пипетки поверхности среды с внесенными ранее инфузориями.

3.4.2.9. Повторный подсчет

Через 1 час после внесения пробы осуществляется подсчет численности подвижных инфузорий.

Повторный подсчет ("второе измерение") количества подвижных тест-организмов осуществляется по алгоритму, указанному в п. 3.3.2.7. Результат токсикологического анализа выдается на экран монитора, принтер и/или файл.

3.3.2.10. Способ культивирования инфузорий стилонихий см. п. 3.3.1.5. Методические указания подготовлены Всероссийским научно-исследовательским институтом пресноводного рыбного хозяйства (ВНИИПРХ), Всероссийским научно-исследовательским институтом рыболовства и океанографии (ВНИРО), Государственным научно-исследовательским институтом пресноводного озерного и речного рыбного хозяйства (ГосНИОРХ), Всероссийским научно-исследовательским институтом ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (ВНИИВСГЭ).

#### Приложение 1

#### к Методическим указаниям по диагностике алиментарных токсикозов у рыб

Токсическое вещество	Признаки
Т-2 токсикон	Снижение содержания белка, липидов и холестерина, повышение азота аминокислот и мочевины в сыворотке крови; при остром токсикозе изменение в гематологических показателей не наблюдается, при длительном воздействии малых доз токсина обнаруживается снижение концентрации гемоглобина и гематокритной величины.
Дезоксиниваленол (ДОН)	Содержание белка в сыворотке не меняется, содержание холестерина имеет тенденцию к повышению.
Афлатоксикоз	Рыба становится вялой, не реагирует на внешние раздражители. Наблюдают потемнение покровов тела, ерошение чешуи, вздутие брюшка. При вскрытии полости тела обнаруживают внутрисполостную жидкость. Печень с желтовато-белыми узелками или серовато-беловатыми опухолями, сильно увеличена. Опухоли дают метастазы по всей печени и во внутренние органы. Множественные опухоли белого цвета и плотной консистенции чаще встречаются в пилорическом отделе желудка, реже-в среднем и заднем отделах кишечника. В паренхиме печени отмечают гиперемиию. Наблюдают выпячивание слизистой оболочки ануса, кровенаполнение

	<b>селезенки, отечность, дряблость и серую окраску почек.</b>
Госсипол	В начальной стадии подавляется рост и изменяются гематологических показателей. При сильных токсикозах отмечают отклонения в печени и почках: гломерулонефрит, некроз печени и селезенки и почек. У белого амура в полости тела обнаруживают либо толстый розовый слой стеариноподобного жира, который окружает внутренние органы, либо бледно-желтый экссудат, при накоплении которого у отдельных рыб появляется пучеглазие.
Продукты окисления жиров	В начальной стадии отмечают повышение содержания малонового диальдегида в мышцах рыб, а также повышение скорости его образования, торможения роста. Повышение гемолиза эритроцитов и активности кислой ДНК-азы в мышцах. При длительном скармливании комбикормов с сильно окисленными жирами наблюдается повышение содержания остаточного азота аминокислот сыворотки, снижение гемоглобина, гематокритного числа и СОЭ, торможение роста рыб.
Высокие дозы паприна, гиприна и др. продуктов микробиосинтеза	Длительное кормление вызывает снижение обшей резистентности содержание белка, азота, аминокислот и липидов в сыворотке.