

P, Vincent JL, Vanhaeverbeek M. Assessment of erythrocyte shape by flow cytometry techniques. J. Clin. Pathol. 2007, 60(5), 549-554.

5. Tan Y., Sun D., Wang J., Huang W. Mechanical characterization of human red blood cells under different osmotic conditions by robotic manipulation with optical tweezers. IEEE Trans Biomed Eng. 2010, 57(7), 1816-1825.

УДК 606

## БІОТЕСТУВАННЯ ЯК МЕТОД БІОТЕХНОЛОГІЇ

*Зимлянський М.О., Гороз Ю.О., Стрелець О.П., Стрельников Л.С.*

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

На сьогоднішній день одним з найбільш популярних методів контролю токсичного забруднення навколишнього середовища та токсичної дії на організм людини косметичних, фармацевтичних, біотехнологічних та промислових продуктів є біотестування. Цей метод контролю оснований на реакції тест-об'єктів на токсичну дію того чи іншого препарату.

З розвитком біології та біотехнології, на сьогоднішній день використовують велике різноманіття тест-об'єктів. Тест-об'єкти – це високочутливі організми, які представлені в межах географічного регіону, доступні для культивування та добре вивчені. Як тест-об'єкт можна використовувати риб, ракоподібних, комах, найпростіших, водорості та багато інших.

Останнім часом найбільш перспективним організмом для визначення токсичності вважається інфузорія туфелька (*Paramecium caudatum*).

Інфузорії – це одноклітинні еукаріотичні організми. Характерна особливість інфузорій – відносно швидка мінливість, яка дозволяє їм адаптуватися до самих різних умов. У міру того як найпростіші адаптуються до умов середовища, перебудовуються всі їх життєві функції, змінюються швидкість руху, темп розмноження і здатність поглинати їжу, а також форма і розміри тіла. Але якщо середовище не змінюється, то властивості інфузорій залишаються стабільними, це і дозволяє використовувати їх як тест-об'єкт [3].

Характерною особливістю інфузорії *Paramecium caudatum* є подразливість. Це здатність організму відповідати певним чином на дії навколишнього середовища. Ця властивість характерна для всіх живих істот. Найпростіші не мають нервової системи, вони сприймають подразнення всією клітиною і здатні відповідати на них рухом, переміщаючись в напрямку подразника або від нього.

Вони володіють високою чутливістю, високою швидкістю розмноження, простотою культивування та подібною, до людського організму, реакцією на токсичну дію препаратів. На кафедрі біотехнології Національного фармацевтичного університету розпочато роботу з вивчення біотестування фармацевтичних, косметичних та біотехнологічних препаратів на токсичність з використанням як тест-об'єктів інфузорій *Paramecium caudatum* [2].

Біотестування – вид біологічного контролю оснований на визначенні тест – реакції тест-організму на токсичну дію препарату на організм.

В основу методу біотестування з використанням як тест-об'єкту інфузорій туфельок покладений один з варіантів визначення гострої токсичності.

Метод визначення гострої токсичності з використанням інфузорій ґрунтується на визначенні кількості загиблих та без рухомих особин в 1% розчині тестуючого препарату.

На першому етапі біотестування необхідно накопичити достатню кількість інфузорій в 1 мл поживного середовища.

Як корм для інфузорій можна використовувати сінний настій, висушені кірки банана, гарбуза, дині, жовтої брукви, нарізану кружальцями моркву, гранули риб'ячого комбікорму, молоко, сушене листя салату, шматочки печінки, дріжджі, водорості, тобто ті субстанції, які або безпосередньо споживаються туфельками (дріжджі, водорості), або є субстратом для розвитку бактерій.

При використанні сіна, його беруть 10 г і поміщають в 1 л води, кип'ятять протягом 20 хв, потім фільтрують і розбавляють рівною кількістю або двома третинами відстояної води. Під час кип'ятіння гинуть всі мікроорганізми, але зберігаються спори бактерій. Через 2 - 3 дні з спор розвиваються сінні палички, які служать їжею для інфузорій. У міру необхідності настій додають в культуру. Настій зберігається в прохолодному місці протягом місяця.

Найбільш простим способом є розведення туфельок на знятому, кип'яченому або згущеному (без цукру) молоці: його вносять в культуру (1 - 2 краплі на 1 л) один раз на тиждень [1].

Для накопичення інфузорій ми використовували поживне середовище Лозина – Лозинського. Для приготування середовища в 1 л дистильованої води розчиняли солі: 0,01 г NaCl, 0,01 г MgSO<sub>4</sub>, 0,01 г CaCl<sub>2</sub>, 0,02 г NaHCO<sub>3</sub> (рН середовища нейтральне).

Годують інфузорій сухими хлібопекарськими дріжджами з періодичністю 7-10 днів, для цього 40 мг дріжджів поміщають в скляну мірну колбу з 60 мл суспензії інфузорій, що знаходяться в середовищі Лозина-Лозинського. Через 7-10 днів після харчування, перед наступним годуванням, суспензія інфузорій відмивають від продуктів метаболізму і корму. На ємність з суспензією інфузорій ставлять дату годування [2].

Відмивання проводять 2-3 рази. Після відмивання середовище не повинно містити залишки плаваючих дріжджів (визначають візуально) і має бути прозорою. Далі суспензію інфузорій використовують для біотестування. Очищували культуру інфузорій від залишків дріжджів та продуктів їх метаболізму шляхом фільтрування. Для цього в мірну колбу об'ємом 250 мл наливали поживне середовище в якому знаходяться інфузорії, в горличко колби вставляли ватний фільтр та зверху фільтру наливали свіжо приготоване поживне середовище. Через деякий час спостерігали як інфузорії перепливають через фільтр в свіже поживне середовище. Після фільтрування визначали кількість інфузорій в 1 мл поживного середовища методом підрахунку в камері Горяєва. В 1 мл середовища повинно бути не менше 5 особин інфузорії. Для проведення біотестування інфузорії повинні бути активними. Проведення

аналізу проводять через 4 дні після годування і відмивання.

Досліджувані препарати розчиняли та розводили до 1% розчину. Після чого брали 1 мл 1% розчину додавали до 1 мл очищеного поживного середовища з інфузоріями та мікроскопували. Підчас мікроскопування визначали час повного зупинення та загибелі 3 особин інфузорії тифельки та порівнювали с часом в контрольному розчині. В якості контрольного розчину (токсикант) використовували 13% розчин етилового спирту та 1% розчин перекису водню. Якщо час зупинення та загибелі інфузорій в досліджувальному препараті був більшим ніж в контролі, то це свідчить про відсутність токсичної дії на організм, а якщо навпаки то це свідчить про гостру токсичну дію препарату на організм.

Іншим розповсюдженим методом біотестування вважають хронічний дослід. Сутність цього дослідження лежить в визначенні токсичності підчас постійного впливу препарату на інфузорію тифельку *Paramecium caudatum* [4].

Для цього досліді використовували в якості контролю поживне середовище Лозина-Лозинського в яке добавляли 1 мл розчину з інфузорією тифелькою. Досліджувальні препарати також розводили до 1% розчину та додавали до нього 1 мл розчину з інфузоріями. Після цього контроль та досліджувальний препарат з інфузоріями культивували протягом 3, 5, 7 діб та підраховували кількість інфузорій в 1 мл розчину. Препарат не вважався токсичним якщо в 1 мл досліджувального розчину кількість інфузорій була рівна або більшою ніж кількість в контрольному середовищі.

Таким чином можна зробити висновок, що вивчення та використання даних методів визначення токсичності препаратів з використанням в якості тест-об'єктів інфузорії тифельки *Paramecium caudatum* є ефективним та може використовуватись в подальших дослідженнях.

#### **Список використаної літератури**

1. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений/ О.П. Мелехова, Е.И. Сарапульцева, Т.И. Евсева и др; под ред. О.П. Мелеховой и Е.И. Сарапульцевой. – 2-е издание, испр. – М.: Издательский центр «Академия», 2010. – 228 с.

2. Биотестирование в вопросах и ответах [Электронный ресурс].- Режим доступа:<http://www.bioassay.narod.ru/biotest/biot.html>

3. Биотестовый анализ-интегральный метод оценки качества окружающей среды: учебно – методическое пособие / А.Г.Губнов [и др.]; под общей редакцией В.И. Гриневича; ГОУ ВПО Иван. гос. хим.–технол. ун-т.-Иваново, 2007. – 112 с.

4. Методические рекомендации: Автоматизированный метод оценки токсичности продовольственного сырья и кормов, объектов окружающей среды на инфузориях *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena pyriformis*. - Утв. РАСХН, 2009. – 11с.