

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА АНАБОЛИЧЕСКУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕДА

В.А. Долгов¹, С.А. Лавина¹, Т.С. Арно¹,
Е.А. Семёнова¹, Д.В. Никитченко²

¹ФГБНУ «ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»
Звенигородское шоссе, 5, Москва, Россия, 123022

²Департамент ветеринарной медицины
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

В результате исследований доказана возможность использования инфузорий *Tetrahymena pyriformis* в исследованиях биологической оценки меда с целью изучения анаболической эффективности меда и влияния на показатель качества различных экологических факторов, что имеет как теоретическое, так и практическое значение.

Ключевые слова: мед, инфузории тетрахимены, биологическая оценка.

Введение. Методы биологической оценки продуктов, кормов и объектов окружающей среды с использованием биотестов, альтернативных высшим животным, достаточно информативны, отличаются высокой производительностью, не требуют сложного оборудования и больших материальных затрат, безупречны с этической точки зрения. Их использование дает возможность интегрированной оценки всех токсичных соединений, в том числе комплексных, присутствующих в исследуемом объекте [1; 5].

В то же время в области биотестирования еще много не до конца исследованных вопросов. Это касается, в первую очередь, проблемы биологической оценки меда, которая в настоящее время практически не изучена.

Нами впервые было установлено, что инфузории *Tetrahymena pyriformis*, сходные по основным параметрам обмена веществ с высшими животными [1; 4], могут служить адекватным тест-организмом при биологической оценке меда, который является хорошим питательным субстратом для простейших. Основным критерием его безвредности и биологической полноценности является анаболическая (ростостимулирующая) эффективность, проявляемая в отношении тетрахимен. Дополнительными критериями могут быть концентрации, вызывающие данный эффект; минимальные концентрации меда, при которых обнаруживается стимуляция роста простейших; максимально переносимые концентрации, а также диапазон концентраций в среде, при котором проявляется его ростостимулирующий эффект. Эти критерии качества и безопасности меда могут определяться при визуальном подсчете количества выросших клеток под микроскопом.

Целью наших исследований было изучение возможности использования разработанных нами методических подходов при биологической оценке меда, подвергнутого воздействию различных факторов внешней среды (хранению, нагреванию, фальсификации), что позволило бы определить степень информативности биотестового метода и целесообразность его практического применения.

Материалы и методы исследований. Материалом для исследований служили образцы меда из различных регионов РФ. В работе применяли разработанные нами методические подходы, которые заключаются в тестировании его различных концентраций в среде (вода) и определении влияния на рост инфузорий [2; 3]. Для этого готовили растворы меда на дистиллированной воде в диапазоне концентраций от 0,1—0,25 до 10%. Растворы вносили во флаконы из под антибиотиков в количестве 2,0 мл, добавляли по 0,1 мл трех-пяти-суточной культуры инфузорий *Tetrahymena pyriformis*, выращенных на пептонной среде следующего состава (г/100 мл дистиллированной воды): пептон бактериологический — 2,0; глюкоза — 0,5; дрожжевой экстракт — 0,1; натрий хлористый — 0,1, pH среды 7—7,5. Флаконы оставляли при комнатной температуре на 24 часа периодически встряхивая их для лучшей аэрации среды и взмучивания исследуемого субстрата. Каждый образец исследовали в трехкратной повторности. Контролем служила дистиллированная вода.

Спустя 24 часа определяли выживаемость инфузорий. Для этого взмучивали содержимое флаконов, брали бактериологической петлей каплю жидкости и исследовали под микроскопом на наличие живых клеток и их подвижность. Для подсчета выросших инфузорий в каждый флакон вносили по одной капле 5%-го спиртового раствора йода (для фиксации клеток), содержимое встряхивали, отбирали пастеровской пипеткой и вносили в счетную камеру Фукса-Розенталя. Подсчет осуществляли в 10 больших квадратах камеры (по 5 квадратов в каждой сетке) для получения среднего результата и соотносили его с количеством клеток в контроле (вода), которое принимали за 100%.

Результаты исследований. При изучении влияния условий хранения меда на его анаболическую эффективность в отношении инфузорий тетрахимен нами было исследовано 12 образцов продукта (5 светлых и 7 темных медов) из различных регионов РФ. Срок хранения составлял 3, 4 и 4,5 года. Образцы хранились как в условиях бытового холодильника (плюс 4 °С), так и при комнатной температуре (плюс 22—25 °С). На основании проведенных исследований установлено, что у большинства изученных образцов (№ 1—10) ростостимулирующая активность меда спустя 3 года хранения не изменилась. Как у светлых, так и у темных медов ростостимулирующая активность после трехлетнего хранения сохранилась на достаточно высоком уровне, аналогичном свежим медам. Светлые образцы, как свежие, так и хранившиеся, стимулировали рост тетрахимен в 1,8—4 раза, темные — в 2—3 раза. Минимальные стимулирующие концентрации составляли от 0,1 до 0,2%, максимальные — от 2 до 4—5% у светлых медов и от 1 до 2% у темных. Максимальные переносимые концентрации у светлых медов были в интервале 4—8%, у темных — от 3 до 5%. В то же время у двух исследованных образцов (№ 11 и 12) темного меда было обнаружено заметное различие в их биологических свойствах, которое проявлялось в существенном снижении ростостимулирующей активности спустя 3 года хранения, что можно видеть из данных, представленных в табл. 1.

Рост инфузорий, в % к контролю (вода)

Концентрация меда, %	Образец № 11		Образец № 12	
	Свежий	Хранившийся	Свежий	Хранившийся
0,25	220	170	120	92
0,5	235	175	150	107
1	280	205	132	65
2	340	190	100	0
3	290	170	75	
4	250	144	9	
5	227	130	0	
6	200	0		
7	95			
8	0			

№ 11 — Орловская область, № 12 — Саратовская область.

Как видно из приведенных данных, у образца № 11 до хранения максимальный ростостимулирующий эффект в отношении инфузорий достигал 280—340% в диапазоне концентраций в среде от 1 до 3%; после трехлетнего хранения он снизился при этих же концентрациях до 175—205%, то есть почти в 2 раза. В меньшей степени была выражена также ростовая эффективность минимальных концентраций меда (соответственно 220% у свежего и 170% у хранившегося медов), а также диапазоны концентраций, при которых она проявляется (у свежего от 0,125 до 6%, у хранившегося от 0,125 до 5%). Уменьшилась и максимально переносимая инфузориями концентрация. Если у свежего меда она составляла от 7 до 8%, то у хранившегося — от 5 до 6%.

Аналогичная и более выраженная картина выявлена и у образца № 12, который после хранения практически не проявлял ростостимулирующий эффект в отношении простейших, а при концентрации меда в среде выше 1% вызывал их гибель, в то время как у свежего продукта максимально переносимая концентрация составляла 4—5%.

Спустя 4—4,5 года хранения практически у всех испытуемых медов, которые проявляли выраженную ростостимулирующую активность, обнаружена тенденция к ее снижению. Если раньше (до 3 лет хранения) этот показатель мог достигать 3—4 кратной величины, то через 4—4,5 года практически у всех изученных образцов меда он уже не превышал 140—190%, а у некоторых был и того ниже (110—120%).

По-видимому, причиной такого заметного снижения биологического качества меда может быть инактивация в процессе хранения биологически активных веществ, которые проявляют биостимулирующее действие (ферментов, гормонов, витаминов и др.). Нельзя исключить и накопления токсичных соединений (например, оксиметилфурфурола, продуктов распада белков, мелаидинов). Вполне вероятно также частичная фальсификация данных медов.

При изучении влияния условий хранения меда (в бытовом холодильнике и при комнатной температуре) на его ростостимулирующую активность не обна-

ружено каких-либо статистически достоверных различий между образцами, хотя органолептически они отличались. Так, мед, хранившийся в холодильнике, был более однородным, плотным и светлым, в то время как продукт, находившийся при комнатной температуре, был более мягким, иногда расслаивался (что характерно для темных медов).

Нами было также изучено влияние нагревания (распускания) меда на его анаболическую эффективность в отношении тетрахимен. Данный технологический прием обычно применяется при розливе и фасовке закристаллизовавшегося меда.

Установлено, что одномоментный высокотемпературный нагрев меда (до 85—90 °С) существенно влиял на его биологическое качество, что проявлялось в снижении роста инфузорий (на 20—49%) по сравнению с исходным продуктом.

Исследовали также более щадящее температурное воздействие, которое применяется в коммерческой практике (прибор «Мелитерм», иммерсионные и пластинчатые нагреватели), а именно кратковременный нагрев меда до относительно высокой температуры с последующим быстрым охлаждением.

Мед прогревали на водяной бане (температура 65—70 °С) до его расплавления, которое обычно наступало через 0,5—1 минуту (температура самого меда при этом не превышала 50—55 °С), затем следовало быстрое охлаждение для минимизации воздействия тепла. Исследовали 7 образцов меда (3 темных и 4 светлых). Результаты анализа приведены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние нагревания на ростостимулирующую активность меда

Вид меда	№ образцов	Количество инфузорий в 1 мл среды		
		Исходный мед	Прогретый мед	% к исходному
Темный	1	$1,16 \cdot 10^4$	$1,19 \cdot 10^4$	102,6
	2	$1,62 \cdot 10^4$	$1,65 \cdot 10^4$	101,9
	3	$1,13 \cdot 10^4$	$1,17 \cdot 10^4$	103,5
Светлый	4	$1,29 \cdot 10^4$	$1,31 \cdot 10^4$	101,6
	5	$1,17 \cdot 10^4$	$0,92 \cdot 10^4$	78,6
	6	$1,34 \cdot 10^4$	$1,09 \cdot 10^4$	81,3
	7	$1,35 \cdot 10^4$	$1,20 \cdot 10^4$	88,9

Из представленных данных видно, что испытанные нами тепловые режимы распускание меда практически не повлияли на его ростостимулирующую активность у образцов 1—4 (темные и один светлый меда) — различия были статистически недостоверными. В то же время у трех образцов светлого меда (№ 5—7) этот показатель несколько снизился (на 11,1—21,4%), что лишнее раз свидетельствует о различии состава и свойств медов, в результате чего однозначно переносить данные, полученные на одном виде продукта, на другой надо с известной долей вероятности. По-видимому, причиной некоторого снижения ростостимулирующей активности трех образцов меда может быть инактивация и денатурация биологически активных веществ (ферментов, гормонов, пептидов и др.), а также возможное образование антиметаболических соединений. Нельзя также исключить

и специфику состава медов, их происхождение, вид цветочной пыльцы, возможное наличие фальсифицирующих примесей. Тем не менее, в целом можно утверждать, что соблюдение щадящих режимов нагрева (не превышающих 50—55 °С) существенного влияния на биологическое качество большинства медов не оказывает.

Для изучения влияния фальсификации на биологические качества меда нами исследовались три образца, которые по органолептическим показателям — цвет, вкус, консистенция, запах — вызвали сомнение в своей натуральности. При биотестировании только один из них проявлял снижение ростового эффекта в отношении инфузорий, в то время как два других отличались высокой ростостимулирующей активностью, что свидетельствует о субъективности органолептического анализа.

Также была смоделирована фальсификация меда сахарным сиропом, который добавляли в продукт в количестве 50%. Данные приведены в табл. 3.

Таблица 3

Ростостимулирующая активность фальсифицированного меда
(в % к исходному)

Исследуемый продукт	Кол-во инфузорий в 1 мл среды	% к контролю
Мед исходный (контроль)	$1,80 \cdot 10^4$	100,0
Мед фальсифицированный	$1,42 \cdot 10^4$	78,9

Из представленных данных видно, что фальсификация меда сахарным сиропом в количестве 50% снижает его ростовой эффект в отношении инфузорий на 21,1%. Учитывая, что нами ранее [2] было установлено практическое отсутствие ростостимулирующей активности сахаров (глюкоза, фруктоза, сахароза), то логично предполагать проявление этих свойств и при добавлении их в мед, что и выразилось в полученных нами результатах. Интересно отметить, что в данном случае 50%-ного снижения ростового эффекта не наблюдалось (что можно было логично предположить исходя из уровня фальсифицирующей примеси). Это является свидетельством того, что мед в силу своего состава и свойств обладает достаточно выраженной буферностью и в определенной степени, как и любой биологически полноценный продукт, нивелирует отрицательное воздействие на его анаболическую эффективность менее питательных компонентов, а при их специально подобранных сочетаниях может существенно затруднять факт обнаружения фальсификации продукта.

Заключение. В результате проведенных исследований показана возможность применения метода биологической оценки меда с использованием инфузорий *Tetrahymena pyriformis* для изучения его анаболической эффективности и влияния на этот качественный показатель различных факторов внешней среды, что имеет как теоретическое, так и практическое значение.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Долгов В.А. Методические аспекты и практическое применение ускоренной биологической оценки кормов, продуктов животноводства и других объектов ветеринарно-санитарного и экологического контроля: Дисс. ... докт. вет. наук. М., 1992.

- [2] Долгов В.А., Лавина С.А., Арно Т.С., Семенова Е.А., Никитченко В.Е. Биологическая оценка меда // Вестник РУДН, сер. Агротомия и животноводство. 2013. № 1. С. 61—67.
- [3] Долгов В.А., Лавина С.А., Арно Т.С., Семенова Е.А. Применение инфузорий тетраимен для биологической оценки меда // Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». 2013. № 1 (9). С. 13—15.
- [4] Игнатъев А.Д., Шаблий В.Я. Использование инфузории тетраимены пириформис как тест-объекта при биологических исследованиях в сельском хозяйстве. М.: ВАСХНИЛ, 1978.
- [5] Лавина С.А. Биотесты на основе ферментных систем для оценки токсического действия ксенобиотиков на объекты ветеринарно-санитарного и экологического контроля: Дисс. ... докт. биол. наук. М., 2002.

EFFECT OF VARIOUS FACTORS FOR ANABOLIC EFFICIENCY OF HONEY

V.A. Dolgov¹, S.A. Lavina¹, T.S. Arno¹,
E.A. Semenova¹, D.V. Nikitchenko²

¹All-Russian scientific research institute of veterinary sanitation
Zvenigorodskoe shosse, 5, Moscow, Russia, 125022

²Department of Veterinary
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklay str., 8/9, Moscow, Russia, 117198

As a result of research it is show the possibility of using biological evaluation of honey with ciliates *Tetrahymena pyriformis* to study the anabolic efficiency of honey and the impact on the quality indicator of various environmental factors that has both theoretical and practical importance.

Key words: honey, ciliates of *Tetrahymena*, biological evaluation.

REFERENCES

- [1] Dolgov V.A. Methodological aspects and practical application of the rapid biological assessment of forages, animal products and other objects of veterinary-sanitary and environmental control. Doctor vet. sciences. M., 1992.
- [2] Dolgov V.A., Lavina S.A., Arnault T.S., Semenova E.A., Nikitchenko E.V. Biological assessment of honey. *Bulletin of Peoples' Friendship University of Russia. Series Agronomy and animal industries*. 2013. No. 1. P. 61—67.
- [3] Dolgov V.A., Lavina S.A., Arnault T.S., Semenova E.A. The Use of the ciliate for biological tetramer evaluation of honey. *Russian journal "problems of veterinary sanitation, hygiene and ecology"*. 2013. No. 1 (9). P. 13—15.
- [4] Ignatiev A.D., Shabliy V.Y. The Use of ciliates of *Tetrahymena pyriformis* as the test subject in biological research in agriculture. Moscow: VASKHNIL, 1978.
- [5] Lavina S.A. Bioassays based on enzyme systems to assess the toxic effect of xenobiotics on the objects of veterinary-sanitary and environmental control. Doctor. biol. sciences. M., 2002.