

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ, ИЗГОТАВЛИВАЕМЫХ ИЗ ПЧЕЛИНОЙ ПЕРГИ

Красочко П.А., Иванов В.Е., Лукьянчик С.А.

РУП «БелНИИЭВ им. С.Н.Вышелесского Республика Беларусь, г. Минск
«Белорусское Общество пропагандистов продуктов пчеловодства»,
г. Минск

Для определения биологической активности биологически активных препаратов используют различные объекты – мыши, крысы, лягушки, дрозофилы, простейшие и др.

Особый интерес представляет собой метод биологической оценки препаратов с использованием простейших реснитчатых инфузорий *Tetrahimeneae piriformis*. Этот тест-организм реагирует на воздействие химических и биологических факторов адекватно высшим животным.

Маточную культуру *Tetrahimeneae piriformis*; выращивали на стандартной среде: пептон бактериологический – 2,0 г; глюкоза медицинская 0,5 г; дрожжевой экстракт-О, 1 г; аптечная морская соль-0,1 г; дистиллированная вода до 100 мл. При этом рН должно быть 7,0-7,5.

Приготовленную среду разливали в колбы емкостью 50,0 мл, чтобы слой жидкости был не выше 1,5 см, закрывали ватно-марлевыми пробками и стерилизовали в автоклаве при 0,5 атм 30 минут или путем кипячения в водяной бане 30-60 минут. Стерильную среду хранили в холодильнике или темном холодном месте. Культуру инфузорий после получения из музея культур микроорганизмов готовили путем посева 0,1 мл инфузорий на 50 мл питательной среды в боксе над спиртовкой с соблюдением правил асептики. Пересев осуществляли каждые 7 дней. Инкубировали культуру инфузорий при $+25 \pm 1^\circ\text{C}$ или при комнатной температуре в темном месте при $+22 \pm 3^\circ\text{C}$ Для консервации культуры инфузорий готовили 1% водный раствор глюкозы. Стерилизацию среды осуществляли при 0,5 атм 20 минут. При консервации в 10 мл 1% раствора глюкозы вносили 0,5 мл культуры инфузорий, выращенных на

стандартной среде в течение трех суток. Хранили колбы после посева культуры в затемненном месте при комнатной температуре до 2-х месяцев. Допускается консервация четырехдневной культуры инфузорий с добавлением 5-7 мл липоцебрина на 10 мл среды и хранение без пересева 3-4 месяца в холодильнике при температуре +2 + 6°С.

При определении биологической активности необходимо использовать синхронную культуру инфузорий, т.е. наличие в ней большинства особей одного и того же возраста. Для достижения этого использовали холодовой шок, что позволило получить около 30-100(х10) особей в мл среды инокулята. Для этого культуру выдерживали 2 часа при +10 °С, затем через 40 минут при +28 °С и так 6 раз, после чего дали клеткам размножаться при нормальной температуре от +22 до +25 °С. В результате этого индекс деления достиг максимума через 4-6 часов и составил 80%.

Для проверки культуры на чистоту необходимо регулярно делать ее посев на скошенный агар 1-2 раза в месяц и ежедневно осматривать суспензии. При загрязненности культуры ежедневно до 4-5 раз пересевают инфузории на свежую питательную среду; выдерживают колбы с культурой при пониженной температуре (+11 +15 °С), что оказывает определенный ингибирующий эффект на посторонние микроорганизмы.

Для испытания использовали пробы препаратов, изготовленных из биологически активных продуктов пчеловодства в рабочей концентрации. Препараты вносили по 0,1 мл во флаконы с 5 мл стерильной водопроводной воды. После этого туда же добавляли по 0,04 мл трехсуточной синхронной культуры инфузорий. Флаконы тщательно встряхивали и помещали в термостат при температуре +25±2 °С или оставляли в темном месте при комнатной температуре на 72 часа, периодически встряхивали с целью аэрации среды. Всего для работы используется не менее, чем по 5 флаконов с культурой инфузорий. Контролем при определении биологической активности служат флаконы с содержанием 5 мл стерильной водопроводной воды и 0,04 мл трехсуточной культуры инфузорий.

Через 24, 48 и 72 часа во флаконы вносили по одной капле 5%-ного спиртового раствора йода или 3 мл фиксирующего раствора формалина, приготовленного по следующей прописи: 20 мл 3% формалина, 175 мг калия фосфорнокислого однозамещенного, 350 мг калия фосфорнокислого двузамещенного и 440 мл дистиллированной воды. В результате этого происходило обездвиживание инфузорий, что облегчало их подсчет. Количественный подсчет инфузорий осуществляли в счетной камере Горяева или Фукса-Розенталя под малым увеличением микроскопа. Количество инфузорий суммируют и выводят среднее количество из трех повторностей. Полученные данные сравнивали и выводили процент роста инфузорий, указывающий на биологическую активность по сравнению с контролем по формуле:

$$X = \frac{N_o \times 100}{N_k},$$

где: X – биологическая активность в %; N_o – среднее число инфузорий в опытных пробах; N_k – среднее число инфузорий в контрольных пробах.

За окончательный результат испытания принимали средние арифметические результаты трех параллельных определений.

Препарат считался активным, если его биологическая активность составляла не менее 50%.

Таким образом, простейшие *Tetrahimeneae piriformis* можно использовать для определения биологической активности препаратов, изготавливаемых на основе биологически активных продуктов пчеловодства.