

УДК 638.144:615.9

06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология (ветеринарные науки)

ОЦЕНКА ОБЩЕЙ ТОКСИЧНОСТИ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ ДЛЯ ПЧЕЛОВОДСТВА

Лысенко Юрий Андреевич
д-р биол. наук, доцент
РИНЦ SPIN-код: 8066-7864, AuthorID: 661417
yuraduban45@mail.ru

Кошчаев Андрей Георгиевич
д-р биол. наук, профессор
РИНЦ SPIN-код: 8508-1224, AuthorID: 138537
kagbio@mail.ru

Лунева Альбина Владимировна
канд. биол. наук, доцент
РИНЦ SPIN-код: 8485-2274, AuthorID: 668708
albina.luneva@mail.ru

Шантыз Азамат Хазретович
д-р вет. наук, профессор
SPIN-код: 1528-4107, AuthorID: 606779
shah_8383@mail.ru

Меренкова Надежда Владимировна
канд. с.-х. наук, доцент
SPIN-код: 1065-2973, AuthorID: 672329
albina.luneva@mail.ru

Иванеева Анна Николаевна
обучающаяся
anytarostov@gmail.com
Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина, Краснодар, Россия

В данной публикации представлены результаты изучения токсичности микробной кормовой добавки предлагаемой для пчеловодства. Исследования проводились с учетом требований нормативного документа ГОСТ 31674-2012. В эксперименте были использованы культура стилонихий (*Stylonychia mytilus*) и лабораторные животные (кролики, мыши). Результаты экспресс-метода показали, что водный и ацетоновый экстракты, полученные из исследуемой добавки не оказали губительного действия на культуру простейших, жизнеспособность во всех группах составила 100,0 %. Анализ дермонекротического действия изучаемой добавки продемонстрировал, что исследуемые экстракты не вызывали кровоизлияния, гиперемии, шелушения, отеков и иной патологии, свидетельствующей о воспалительном процессе на коже лабораторных кроликов. Проведение острого эксперимента

UDC 638.144:615.9

06.02.02 – Veterinary microbiology, virology, epizootology, mycology with mycotoxicology and immunology (veterinary sciences)

ASSESSMENT OF TOTAL TOXICITY OF A FEED ADDITIVE FOR BEEKEEPING

Lysenko Yury Andreevich
Dr.Sci.Biol., assistant professor
RSCI SPIN-code: 8066-7864, AuthorID: 661417
yuraduban45@mail.ru

Koshchayev Andrey Georgiyevich
Dr.Sci.Biol., Professor
RSCI SPIN-code: 8508-1224, AuthorID: 138537
kagbio@mail.ru

Luneva Albina Vladimirovna
Cand.Biol.Sci., assistant professor
RSCI SPIN-code: 8485-2274, AuthorID: 668708
albina.luneva@mail.ru

Shantiz Azamat Hazretovich
Dr.Sci.Vet., Professor
RSCI SPIN-code: 1528-4107, AuthorID: 606779
shah_8383@mail.ru

Merenkova Nadezhda Vladimirovna
Cand.Agr.Sci., associate professor
RSCI SPIN-code: 1065-2973, AuthorID: 672329
albina.luneva@mail.ru

Ivaneeva Anna Nikolaevna
student
anytarostov@gmail.com
Kuban state agrarian university of I. T. Trubilin, Krasnodar, Russia

This publication presents the results of a study of toxicity of microbial feed additives offered for beekeeping. The research was carried with regard to requirements of the normative document GOST 31674-2012. The culture of *Stylonychia mytilus* and laboratory animals (rabbits, mice) were used in the experiment. The results of the express method showed that aqueous and acetone extracts obtained from the studied additive did not have a detrimental effect on the culture of protozoa, the viability was 100.0 % in all groups. The analysis of the dermonecrotic effect of the studied additive demonstrated that the studied extracts did not cause hemorrhages, hyperemia, peeling, edema and other pathology indicating an inflammatory process on the skin of laboratory rabbits. The experiment confirmed the safety of the studied microbial additive, since during the research the laboratory mice remained

подтвердило безопасность исследуемой микробной добавки, так как в процессе исследований лабораторные мыши оставались активными, подвижными, признаков отравления и иной патологии – не установлено, а проведенное патологоанатомическое вскрытие не выявило поражений паренхиматозных органов лабораторных тест-объектов

active, mobile, no signs of poisoning or other pathology were found, and the conducted pathoanatomical autopsy did not reveal lesions of parenchymal organs of laboratory test objects

Ключевые слова: КОРМОВАЯ ДОБАВКА, ПРОБИОТИК, ГОСТ, ОБЩАЯ ТОКСИЧНОСТЬ, *STYLONYCHIA MYTILUS*, МЫШЬ, КРОЛИК, ЭКСПРЕСС-МЕТОД, ДЕРМОНЕКРОТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ, ОСТРЫЙ ОПЫТ

Keywords: FEED ADDITIVE, PROBIOTIC, GOST, GENERAL TOXICITY, *STYLONYCHIA MYTILUS*, MOUSE, RABBIT, EXPRESS METHOD, DERMONECROTIC EFFECT, ACUTE EXPERIENCE

DOI: <http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-168-022>

Введение

Исходя из научных данных, медоносные пчёлы существовали и выживали миллионы лет до появления человека. Такому длительному существованию без вмешательств извне, несомненно, поспособствовал врожденный комплекс защитных реакций организма – иммунитет [5].

В сравнении со странами Евросоюза Россия владеет более благоприятными условиями, которые могут позволить не только удерживать отрасль на нынешнем уровне, но и удвоить численность пчелиных семей и значительно увеличить производство меда. Несмотря на это, на территории нашей страны располагаются различные природно – климатические зоны, что влияет на показатели продуктивности пчеловодческих хозяйств. В России первое место по развитию пчеловодства занимает Республика Башкортостан [1].

К широкому распространению возбудителей различных заболеваний в промышленном пчеловодстве могут приводить различные факторы, такие как концентрация семей пчел, передвижения пасек, трудности изолирования пчел на местности, обмен племенной продукцией внутри страны или в международном масштабе. Помимо искусственных факторов существуют и природные особенности распространения заболеваний среди пчёл: смена дислокации пчелиных семей, нападения на более слабые семьи, также другие виды насекомых имеют общих возбудителей

заболеваний с медоносными пчёлами. Именно поэтому современное пчеловодство нуждается в применении антибиотиков, сульфаниламидов, азолов, амитраза, синтетических пиретроидов и других препаратов при одновременном проведении комплекса ветеринарно-санитарных мероприятий [6].

В современном пчеловодстве внимание специалистов привлекают препараты на основе природных биологически активных веществ. Целью данных препаратов является укрепление собственного иммунитета пчёл и повышению резистентности к различным стресс факторам.

Исходя из вышесказанного, поиск новых добавок, обеспечивающих повышение естественной резистентности, усиление обменных процессов, увеличению продуктивности и жизнеспособности данных насекомых, является актуальным направлением.

Работа проведена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (соглашение № 075-15-2020-253 от 17.03.2020).

Материалы и методы исследований. Исследования осуществляли на кафедре биотехнологии, биохимии и биофизики, а также базе научно-испытательного центра токсико-фармакологических исследований и разработки лекарственных средств ветеринарного применения, кормовых добавок и дезинфектантов (НИЦ Ветфармбиоцентр), являющийся структурным подразделением ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина».

Объектом исследований служила пробиотическая добавка, действующим началом которой являлись живые формы микроорганизмов (*Lactobacillus kunkeei*), выделенные из трутневого молочка медоносной пчелы и выращенные глубинным способом в мелассной питательной среде для применения в пчеловодстве [7].

Из биообъектов в экспериментах были использованы: простейшие рода брюхоресничных инфузорий (*Stylonychia mytilus*) и лабораторные животные (мыши, кролики).

Токсикологические опыты пробиотической добавки осуществлялись экспресс-методом, с помощью биотестирования на стилонихиях, а также основным методом определения общей токсичности на кроликах и мышах (ГОСТ 31674-2012) [2]. Содержание лабораторных животных соответствовало нормативной документации (ГОСТ 33216-2014) [3], они имели свободный доступ к воде и получали лабораторный гранулированный корм «Чара», изготовленного согласно ГОСТ 34566-2019 [4]. Перед постановкой опыта лабораторные животные проходили семидневный карантин, а затем акклиматизацию в экспериментальном помещении в течении пяти суток.

Экспресс-метод определения общей токсичности пробиотической добавки проводили в научно-исследовательском помещении кафедры биотехнологии, биохимии и биофизики Кубанского ГАУ на суточной культуре *Stylonychia mytilus*, находящейся в логарифмической фазе роста. Для этого культуру *Stylonychia mytilus* подвергали действию водного и ацетонового экстрактов с содержанием различных фракций токсических веществ, извлеченных из анализируемой добавки водой и ацетоном. Результат экспресс-метода оценивали по количеству погибших стилонихий в пяти проворностях. Нетоксичной считается добавка, в которой при одновременном параллельном использовании водной и ацетоновой вытяжек 70–100 % инфузорий не погибли. В качестве контроля использовали 1,0 %-ный ацетоновый раствор (1,0 % А р-р) и раствор Лозина-Лозинского (р-р ЛЛ). Реакцию жизнеспособности инфузорий (N, %) вычисляли по формуле:

$$N = N_2 / N_1 \times 100,$$

где N_2 – среднеарифметическое (из пяти испытаний) значение количества стилонихий в конце опыта через 1 ч экспозиции, шт.; N_1 – среднеарифметическое (из пяти испытаний) значение количества стилонихий в начале опыта, шт.; 100 – коэффициент перевода результата в проценты.

Метод определения общей токсичности кормовой добавки на лабораторных животных подразумевает её биотестирование параллельно на кроликах (кожная проба) и мышах (острый опыт), что дает возможность учесть как дермонекротическое действие токсинов, так и их воздействие на пищеварительную систему теплокровных животных.

Для проведения кожно-резорбтивного исследования на выстриженные участки кожи двух лабораторных кроликов (на одной стороне) пластиковой лопаткой наносили водный и ацетоновый экстракты. В качестве контрольного поля для оценивания результата исследований использовали выстриженный участок кожи на симметричной стороне кроликов, который не подвергался обработке. Для предупреждения слизывания экстрактов на шею животных надевали воротник. Продолжительность опыта – 72–120 ч. Токсичность пробиотической добавки оценивали по наличию или отсутствию воспалительной реакции на оголенных участках кожи кроликов с нанесенными экстрактами в двух параллельных исследованиях.

Для проведения острого опыта на мышах осуществляли извлечение токсичных веществ из добавки ацетоном и водой и вводили их в желудок лабораторным животным. В эксперименте было использовано 20 белых мышей с живой массой от 18 до 22 г, которых предварительно выдерживали на голодной диете в течении 6 ч. Таким образом, было сформировано 4 группы животных: 1-я контрольная группа – животным вводили в желудок растительное масло для сравнения с группой, которым

вводили ацетоновый экстракт в объеме 0,5 мл; 2-я контрольная группа – мышам вводили в желудок дистиллированную воду для сравнения с группой, которым вводили водный экстракт в объеме 0,5 мл; 1-я опытная группа – лабораторным животным вводили в желудок ацетоновый экстракт в объеме 0,5 мл; 2-я опытная группа – лабораторным биообъектам вводили в желудок водный экстракт в объеме 0,5 мл. Наблюдение за лабораторными мышами проводилось в течении 3-х дней. Оценку результата опыта осуществляли на основании анализа состояния желудочно-кишечного тракта, печени, селезенки и почек при патологоанатомическом вскрытии лабораторных мышей. Добавку считали нетоксичной, в случае когда все лабораторные животные оставались жизнеспособными, а при их вскрытии не было зафиксировано патологоанатомических изменений.

Результаты исследований и их обсуждение. Так как на сегодняшний день на территории Российской Федерации отсутствует четкий регламент проведения токсичности (безопасности) используемой в научно-исследовательской работе кормовой добавки, было принято решение осуществить данные эксперименты ссылаясь на методы определения общей токсичности согласно ГОСТ 31674-2012. Данные методы являются качественными и дают возможность оценить общую токсичность кормов, комбикормов, комбикормового сырья и кормовых добавок.

Первым этапом исследований было проведение ускоренного или предварительного биотестирования анализируемой пробиотической добавки, что позволяет в течение малого промежутка времени (1,5–3 ч) определить токсичность добавки на *Styloynchia mytilus*. Результаты экспресс-метода на *Styloynchia mytilus* представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты экспресс-метода на *Stylonychia mytilus*

Группы	Кол-во стилонихий, шт.	Повторности					N, %
		1	2	3	4	5	
Контроль (р-р ЛЛ)	N ₁	20,0	19,0	19,0	18,0	19,0	100,0
	N ₂	20,0	19,0	19,0	18,0	19,0	
Контроль (1,0 % А р-р)	N ₁	17,0	18,0	19,0	19,0	19,0	100,0
	N ₂	17,0	18,0	19,0	19,0	19,0	
Водный экстракт добавки	N ₁	19,0	17,0	17,0	17,0	19,0	100,0
	N ₂	19,0	17,0	17,0	17,0	19,0	
Ацетоновый экстракт добавки	N ₁	20,0	19,0	19,0	18,0	17,0	100,0
	N ₂	20,0	19,0	19,0	18,0	17,0	

В результате проведенных исследований установлено, что в контроле, где в качестве раствора использовали жидкость Лозина-Лозинского ни в одной из повторностей в конце опыта не было зафиксировано изменений в количестве стилонихий, показатель жизнеспособности был равен 100,0 %. В контрольной группе, где применяли 1,0 %-й раствор ацетона показатель жизнеспособности инфузорий составил аналогично одноименной группе - 100,0 %. При анализе численности *Stylonychia mytilus* на конец опыта в группах где применяли водный и ацетоновый экстракты пробиотической добавки, исследуемый показатель во всех пяти повторностях оставался аналогичным на начало опыта. В целом показатель жизнеспособности в данных группах составил также 100,0 %.

Таким образом, экспресс-оценка продемонстрировала, что во всех опытах показатель жизнеспособности составил 100,0 %, что согласно ГОСТ 31674-2012 подтверждает не токсичность исследуемой добавки.

Следующим важным этапом исследований, дающий максимально достоверные результаты является изучение безопасности кормовой добавки путем проведения основного метода определения общей токсичности на кроликах и мышах согласно ГОСТ 31674-2012.

Подготовка к дермонекротическому изучению добавки на тест-биообъекте включала в себя выстригание шерстного покрова в области бедра кроликов и лопатки с одной стороны и с другой стороны только сбоку участка кожи размером 6,0×6,0 см и дальнейшее нанесение на участки изучаемых экстрактов. При этом, чтобы не получить искаженных результатов исследований при визуализации реакции кожа подопытных кроликов была без повреждений и пигментаций. Токсичность добавки определяли по наличию воспалительной реакции на выстриженном участке кожи, находящимся в контакте с изучаемым экстрактом [2].

В результате проведенных исследований не было зафиксировано кровоизлияния, гиперемии, шелушения, отеков и иной патологии, свидетельствующей о воспалительном процессе. Животные оставались активны, охотно употребляли корма и воду, болевых признаков при надавливании на исследуемые участки кожи не выявлялось. Таким образом, результаты двух параллельных биотестов на кроликах продемонстрировали отсутствие токсикологического свойства изучаемой пробиотической добавки.

При проведении острого эксперимента на мышах, предварительно тест-биообъекты в количестве пяти голов в каждой группе отсаживали в отдельные клетки без дачи корма в течение 6 ч. Далее согласно плану исследований мышам всех групп с применением специального ротопищеводного (питательного) зонда однократно вводили *per os* анализируемые экстракты и контрольные растворы. В течение 72 часов вели наблюдение за мышами, предоставив им неограниченный доступ к комбикорму и питьевой воде. Результаты жизнеспособности подопытных лабораторных животных представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты острого опыта на мышах

Группа	Вид тест-объекта	Объём, раствор, способ введения	Результат испытаний, гол.	
			пало	Выжило
1-я контрольная	Лабораторная мышь	0,5 мл, растительное масло, <i>per os</i>	0	5
2-я контрольная		0,5 мл, дистиллированная вода, <i>per os</i>	0	5
1-я опытная		0,5 мл, ацетоновый экстракт добавки, <i>per os</i>	0	5
2-я опытная		0,5 мл, водный экстракт добавки, <i>per os</i>	0	5

Результаты проведённого эксперимента при введении мышам исследуемой добавки показали, что с после 3-ёх суток гибели лабораторных животных не наблюдалось. Подопытные биообъекты оставались активными, подвижными, признаков отравления и иной патологии – не установлено. Для подтверждения безопасности микробной добавки проводилось умерщвление лабораторных мышей с соблюдением требований гуманности к лабораторным животным, при этом изучали состояние отдельных органов биообъектов (желудочно-кишечный тракт, печень селезенку, почки) путём патологоанатомического вскрытия. Результаты исследований продемонстрировали, что у мышей всех групп геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта отсутствовало, дегенерация печени, почек и селезенки не отмечалось, кровоизлияний в паренхиматозных органов – не установлено. Расположение исследуемых органов в полости было анатомически правильным.

Таким образом, результаты научно-исследовательской работы продемонстрировали, что в опытах на простейших (*Stylomyxa mytilus*), а также при параллельном анализе исследуемой добавки на кроликах и мышах – биообъекты оставались жизнеспособны и без признаков патологии. В целом можно сделать заключение, что разработанная

пробиотическая добавка согласно ГОСТ 31674-2012 может быть использована без ограничений.

Список литературы

1. Аспекты стратегии развития пчеловодства в России / Л. В. Прокофьева, Ю. В. Докукин, Я. Л. Шагун, В. И. Лебедев // Пчеловодство. – 2017. – Т. 2. – С. 6–7.
2. ГОСТ 31674-2012. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности (с Изменением N 1). Введ. 2013-07-01. – М.: Стандартиформ, 2014. – 42 с.
3. ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами (Переиздание). Введ. 2016-07-01. – М.: Стандартиформ, 2019. – 24 с.
4. ГОСТ 34566-2019. Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия. Введ. 2020-10-01. – М.: Стандартиформ, 2019. – 14 с.
5. Полищук, В. П. Пасека / В. П. Полищук, В. А. Гайдар, О. В. Корбут. – Киев, 2012. – 340 с.
6. Рожков, К. А. Медоносная пчела. Содержание, кормление и уход / К. А. Рожков, С. Н. Хохрин, А. Ф. Кузнецов. – М.: Лань, 2014. – 432 с.
7. Biological properties of microorganisms isolated from drone milk of honeybees / Lysenko Yu.A., Koshchaev A.G., Lysenko A.A., Omarov R.S., Shlykov S.N. // International Transaction Journal of Engineering, Management and Applied Sciences and Technologies. – 2020. – Т. 11. № 12. – С. 11A12K.
8. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees – an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities / T. C. Olofsson, E. Butler, P. Markowicz, C. Lindholm, L. Larsson, A. Vasquez // Int. Wound J. – 2016. – Vol. 13. – P. 668–679.

References

1. Aspekty strategii razvitija pchelovodstva v Rossii / L. V. Prokof'eva, Ju. V. Dokukin, Ja. L. Shagun, V. I. Lebedev // Pchelovodstvo. – 2017. – Т. 2. – С. 6–7.
2. GOST 31674-2012. Korma, kombikorma, kombikormovoe syr'e. Metody opredelenija obshhej toksichnosti (s Izmeneniem N 1). Vved. 2013-07-01. – M.: Standartinform, 2014. – 42 s.
3. GOST 33216-2014. Rukovodstvo po sodержaniju i uhodu za laboratornymi zhivotnymi. Pravila sodержanija i uhoda za laboratornymi gryzunami i krolikami (Pereizdanie). Vved. 2016-07-01. – M.: Standartinform, 2019. – 24 s.
4. GOST 34566-2019. Kombikorma polnoracionnye dlja laboratornyh zhivotnyh. Tehnicheskie uslovija. Vved. 2020-10-01. – M.: Standartinform, 2019. – 14 s.
5. Polishhuk, V. P. Paseka / V. P. Polishhuk, V. A. Gajdar, O. V. Korbut. – Kiev, 2012. – 340 s.
6. Rozhkov, K. A. Medonosnaja pchela. Soderzhanie, kormlenie i uhod / K. A. Rozhkov, S. N. Hohrin, A. F. Kuznecov. – M.: Lan', 2014. – 432 s.
7. Biological properties of microorganisms isolated from drone milk of honeybees / Lysenko Yu.A., Koshchaev A.G., Lysenko A.A., Omarov R.S., Shlykov S.N. // International Transaction Journal of Engineering, Management and Applied Sciences and Technologies. – 2020. – Т. 11. № 12. – С. 11A12K.
8. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees – an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities / T. C. Olofsson, E. Butler, P. Markowicz, C. Lindholm, L. Larsson, A. Vasquez // Int. Wound J. – 2016. – Vol. 13. – P. 668–679.