

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕЙ ТОКСИЧНОСТИ*

О ГОСТ 31674-2012 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения токсичности»

К рассмотрению недостатков методов определения токсичности автор статьи **Андрей Олегович Гроздов**, кандидат биологических наук, возвращается не первый раз. В 2006 г. в трех номерах были опубликованы статьи под названием «О новом стандарте по определению общей токсичности», в них был дан анализ введенного в действие ГОСТ Р 52337-2005 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности». К сожалению, ни одно из замечаний автора не было учтено при создании последующих ГОСТ. Это послужило поводом вновь обратиться к данной теме.



Действующий межгосударственный стандарт ГОСТ 31674-2012 с Изменением №1 от 2017 г. «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности» включает экспресс-методы на инфузориях и основные методы. Начнем с основных, или арбитражных, методов с использованием высших теплокровных животных — мышей и кроликов. Они являются подтверждающими и окончательными и предусматривают комплексные исследования на кроликах и на мышах, что позволяет в течение 3–5 суток дать окончательное заключение о токсичности корма. Результат определяют по совокупности реакций в обоих методах: корм нетоксичный (нетоксичен в обоих тестах) и корм токсичный (токсичен хотя бы в одном teste).

Рассмотрим подробно каждый арбитражный метод.

1. Определение общей токсичности кормов биопробой на кролике (кожная проба). Кожная проба кролика — одна из разновидностей теста Драйза (Draize и соавт., 1944), который широко использовался во второй половине прошлого века для оценки повреждающего и раздражающего действия различных препаратов на глаза и кожные покровы лабораторных животных. В России тест Драйза был адаптирован во ВНИИ ветеринарной санитарии в 1944 г. для определения на кролике токсичности кормов, фуражного зерна и продуктов его переработки и известен как кожная проба. Это один из самых болезненных тестов для животных, поэтому он был запрещен в 1998 г., как уже упоминалось выше.

Воспалительную реакцию кожи кролика вызывают не все токсины, а только микотоксины дермонекротического действия. А, например, охратоксины, крайне опасные для

птицеводства и свиноводства, не вызывают воспалительную реакцию. Кроме того, эпидермальные клетки склонны к аллергическим реакциям. Вследствие этого входящие в состав современных комбикормов различные премиксы, консерванты, колоранты и ароматизаторы могут вызывать обыкновенную кожную экзему, не связанную с токсичностью комбикормов. Об этом недостатке кожной пробы кролика знали еще 40 лет назад, поэтому в ГОСТ 13496.7-87 «Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения токсичности» этот метод был оставлен только для тестирования зерна и продуктов его переработки, а токсичность комбикормов определялась на белых мышах по воспалительной реакции ткани при подкожном введении ацетоновых экстрактов комбикормов.

Разработанный во ВНИИ комбикормовой промышленности в 1986 г. метод с пробами на белых мышах является классическим примером моделирования комбикормов с микотоксинами. Построенная модель полнофакторного эксперимента с четырьмя микотоксинами с научной точки зрения была безусловно правильной, поэтому указанный метод был включен в ГОСТ без производственной проверки. Однако модель не повторяется на практике, так как существует великое множество сочетаний различных видов токсинов в комбикормах. Практическое использование этого метода в хозяйствах полностью показало его несостоятельность, в результате чего в ГОСТ 13496.7-92 его отменили. Арбитражным методом при определении токсичности комбикормов, несмотря на указанный выше недостаток, вновь стала кожная проба на кролике.

2. Определение общей токсичности на мышах. Этот метод был утвержден 28.12.1979 г. Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР (ГУВ МСХ СССР) и предназначен для определения токсичности шротов, жмыхов и кормовых дрожжей. Основан он

*Окончание. Начало в №3-2025.

на извлечении токсических веществ ацетоном и введении концентрированного экстракта однократно в желудок пяти белым мышам. В дальнейшем метод стал широко применяться в токсикобиологических исследованиях для определения токсичности комбикормов и его компонентов. При этом не учитывалось, что качественный и количественный состав токсических веществ в шротах, жмыхах и кормовых дрожжах может существенно различаться с присутствующими в комбикормах токсинами. От других лабораторных животных мыши отличаются наибольшей токсикорезистентностью, то есть малой чувствительностью к афлатоксину B1 и охратоксину A, в то время как к охратоксину наиболее чувствительны птица и свиньи.

В те годы не было утверждающих и разрешающих документов ГУВ МСХ СССР на использование метода на мышах для определения токсичности комбикормов. В 1986 г. в системе Министерства хлебопродуктов СССР были разработаны рекомендации, но опять же по контролю качества импортного сырья для производства комбикормов, в которых указывалось, что более объективное токсикологическое состояние выявляется с помощью теста на белых мышах. При этом важно помнить, что тест на белых мышах требует очень осторожного исполнения. При незначительном повреждении пищевода тупой иглой во время введения экстракта можно получить неадекватную токсичности реакцию в опыте и даже отход в контроле при введении растительного масла.

Теперь подойдем к основному вопросу: могут ли использоваться метод кожной пробы на кролике и метод на белых мышах в качестве арбитражных для определения токсичности современных комбикормов? Следует отметить, что первому методу в этом году исполнится 81 год (с 1944 г.), а второму — 46 лет (с 1979 г.). Комбикорма нового поколения существенно отличаются по составу от комбикормов даже 30-летней давности. Применяемые в действующем ГОСТ 31674-2012 (с Изменением №1) арбитражные методы не учли произошедших качественных изменений в составе комбикормов. Сегодня на них цыплята современных кроссов в определенные периоды жизни могут давать приrostы до 60–70 г в сутки, в то время как 30 лет назад 23–25-граммовые приросты считались вполне хорошими. Из этого следует, что арбитражные методы — это методы прошлого века. Более современными методами, которые в отличие от арбитражных регистрируют токсическое действие всего комплекса токсинов, являются экспресс-методы на инфузориях. Приведем пример применения экспресс-метода с использованием инфузорий стилонихий в 1998 г. (тестирование только водных растворов ацетоновых экстрактов) на Кинешемской птицефабрике (500 тыс. голов птицы, из них 250 тыс. промышленные несушки и 250 тыс. ремонтный молодняк). Результаты биоанализа на инфузориях стилонихиях в большей степени совпадали с птицеводческими показателями, нежели на кроликах. Совпадение составляло 90%. Аналогичные

показатели получили в совхозе «Пермский» (поголовье 160 тыс. свиней) в период с 1990 по 1997 г.

Статус арбитражных методов по сравнению с экспрессными методами предполагает более высокую достоверность результатов тестирования комбикормов, то есть большую сходимость с объектами сельскохозяйственного выращивания. Как видно из приведенных примеров, они не справляются с этой задачей. Возникает вопрос: нужны ли арбитражные методы на теплокровных животных, достоверность которых ниже экспрессных методов на инфузориях. Вероятно, нужны арбитражные лаборатории, которые определяли бы при спорных вопросах достоверность результатов, полученных теми же методами в производственно-технологических лабораториях на сельскохозяйственных предприятиях. Для этого достоверность экспресс-методов должна быть максимальной, но это возможно только при соблюдении определенных условий, которые неполно отражены в действующем ГОСТ. Остановимся на этом подробнее.

Для обеспечения сопоставимых результатов биотестирования одних и тех же проб комбикормов (сырья) в разных лабораториях все условия культивирования инфузорий, подготовки проб и проведения тестирования необходимо унифицировать до мельчайших подробностей в методиках и утвердить в национальных или межгосударственных стандартах. Любое изменение в условиях культивирования, включая температуру, освещение, кормление, состав среды культивирования, приводит к изменению токсикорезистентности инфузорий (устойчивости к токсическому воздействию) и к недостоверным результатам. Их также можно получить и при незначительном нарушении подготовки культуры инфузорий и проб к тестированию, а также при его проведении.

Рассмотрим, насколько соответствует указанным требованиям ГОСТ 31674-2012.

Пункт 4.1.2.3. Средой для культивирования инфузорий и разбавления ацетоновых экстрактов кормов служит раствор Лозина-Лозинского, который приведен с двумя ошибками (правильно он был указан Д.О. Виноходовым в ГОСТ 13496.7-97, пункт 7.3.1), а именно: концентрации CaCl_2 и MgCl_2 даны для кристаллогидратов, а не для безводной соли, как должно быть. В результате этого концентрация CaCl_2 в среде культивирования занижена в 1,3 раза, а MgCl_2 — в 2,1 раза. Учитывая, что ионы Ca и Mg активно участвуют в движении ионов через плазматическую мембрану, длительное культивирование инфузорий на такой обедненной среде может быть затруднено или может измениться чувствительность инфузорий к действию токсинов.

Пункт 4.1.2.5. В качестве корма для стилонихий предлагаются хлебопекарные прессованные дрожжи, произведенные в соответствии с ГОСТ 171-81 «Дрожжи хлебопекарные прессованные. Технические условия»,

которые предварительно высушивают в сушильном шкафу. Снижение качества этих дрожжей на многих заводах-изготовителях является в настоящее время одним из основных факторов, влияющих на вырождение культуры. Корм для стилонихий необходимо унифицировать, а для этого использовать готовые к применению сухие гранулированные пекарские дрожжи без консервантов, какими являются дрожжи хлебопекарные сушеные, выработанные по ГОСТ Р 54845-2011 под торговым названием «Приправыч. Хлебопекарные сушеные дрожжи. Быстродействующие». Их производит АО Компания «Проксима» из Новосибирска. При культивировании в чашку Петри вносят пинцетом, предварительно обработанным этиловым спиртом и подсушенным, две гранулы таких дрожжей.

Пункт 4.1.2.6. В этом пункте условия освещенности не унифицированы. Культивирование инфузорий можно проводить в термостате, то есть в темноте, а также вне термостата, используя для поддержания постоянной температуры лампу дневного света, то есть при постоянном освещении. Инфузории, культивируемые в течение полугода в темноте и на свету, дают совершенно разные результаты при биотестировании одного и того же образца. Длительное культивирование инфузорий в темноте (около года) приводит к значительному возрастанию их токсикорезистентности, в результате чего они не выявляют даже высокую токсичность корма. Этот «темновой» эффект наблюдался нами на одном из комбикормовых заводов Московской области, в лаборатории которого культивирование инфузорий проводили около года в темноте в суховоздушном термостате при остальных стандартизованных условиях культивирования.

Условия освещенности должны быть унифицированы. Разработчики экспресс-метода на инфузориях стилонихиях проводили культивирование с фотопериодизмом (сменой дня и ночи). Это обусловлено тем, что исторически в естественных условиях в активном состоянии инфузории существовали при смене дня и ночи. В лабораторных условиях для создания оптимальной температуры разработчики использовали две лампы дневного света, располагая их на высоте по показанию термометра, находящегося рядом с чашками Петри с культурой инфузорий. На ночь для затемнения чашки Петри со всех сторон прикрывали черной светонепроницаемой фотобумагой (сейчас для этого можно использовать картон), не допуская перегрева культуры (по показанию термометра) и при необходимости включая вентилятор. При культивировании инфузорий в суховоздушном термостате необходимо установить в нем маломощную лампу дневного света с реле времени, регулирующим 14 часов — день и 10 часов — ночь.

Пункт 4.1.2.7. В этом пункте сообщается, что для получения достоверных результатов биотестирования один раз в месяц необходимо проверять реакцию культуры на действие модельного токсиканта (раствора сернокислой меди в определенной концентрации) в течение 30 мин. Результат

при этом считают удовлетворительным, если выживают не менее 50% стилонихий. Вопрос: а если выживают 100% инфузорий, результат также считается удовлетворительным? По данной оценке, ответ положительный. В итоге не удается выявлять культуру с повышенной устойчивостью к токсическому воздействию (токсикорезистентностью), которая возникает при длительном культивировании инфузорий в «темновых» условиях в термостате. Оценка должна быть корректной и соответствовать токсикологическим нормам, то есть при действии модельного токсиканта результат считают удовлетворительным, если выживают 50% ± 10% стилонихий. При выживаемости ниже 40% культура обладает пониженной токсикорезистентностью, то есть ослаблена по каким-то причинам, а при выживаемости более 60% — повышенной токсикорезистентностью.

Пункт 4.1.2.10. В нем не сказано, как отделяют надосадочную жидкость после центрифугирования водного экстракта. После центрифугирования на дне центрифужной пробирки образуется осадок, а в верхней ее части — слой жира. В связи с этим последнее предложение в пункте необходимо дополнить следующим: «... и отделяют надосадочную жидкость путем фильтрации центрифугата через бумажный фильтр».

Пункт 4.1.3. В этом пункте описывается алгоритм испытания. Оно начинается с посадки инфузорий в микроаквариумы. Автоматической пипеткой отбирают 20 мкл среды со стилонихиями и помещают в каждый из пяти микроаквариумов или лунок предметного стекла. Но автоматической пипеткой невозможно отобрать нужное количество инфузорий, не захватив при этом частички корма (дрожжей). Чаще всего для этого используют калиброванные стеклянные пипетки, внося в каждый микроаквариум по одной капле с инфузориями, так проще и быстрее. В этом случае необходимо соблюдать строго определенный порядок посадки. Инфузории из чашки Петри по одной капле вносят в каждую лунку, вдоль блока луночных микроаквариумов (ряды с пробами расположены поперек), таким образом, чтобы последующая капля попала в лунку следующей по порядку пробы. Необходимость такого внесения инфузорий в лунки связана с образованием в чашке Петри обособленных скоплений инфузорий с различной токсикорезистентностью. Происходит равномерное распределение разночувствительных инфузорий в лунках для каждой пробы, и результаты параллельных исследований одной и той же пробы максимально совпадают.

В пятом абзаце пункта сообщается: «Перед каждым внесением раствора экстракта анализируемой пробы в микроаквариум или лунку наконечник пипетки следует вытираять ватой во избежание попадания в них жировых загрязнений с наружной стороны пипетки». Эта операция полностью зависит от внимательности экспериментатора, то есть она субъективна и требует унифицирования. Указанный абзац необходимо исключить, а пункт 4.1.2.9. (перед таблицей) дополнить предложением: «Полученный водный раствор

ацетонового экстракта для избавления от крупнодисперсного жира фильтруют через бумажный фильтр».

Пункт 4.1.4. посвящен обработке результатов. В нем указано, что допускаемое расхождение между результатами двух параллельных определений при доверительной вероятности $P = 0,95$ не должно превышать 1%. Это требование практически невыполнимо, так как культура инфузорий неклональная, а ошибка визуального подсчета инфузорий выше указанной величины.

Достоверность и воспроизводимость экспресс-методов определения общей токсичности кормов с помощью инфузорий является основной задачей ГОСТ 31674-2012, так как корма, отнесенные по результатам биотестирования к нетоксичным, используют по назначению. Из изложенного выше следует, что данный нормативный документ нуждается в соответствующей доработке.

В соответствии с ГОСТ 31674-2012 (с Изменением №1) для экспрессного определения токсичности комбикормов и сырья используются четыре вида инфузорий: стилонихии (*Styloynchia mytilus*), колподы (*Colpoda steinii*), парамецции (*Paramecium caudatum*) и тетрахимена (*Tetrahymena pyriformis*). В принципе, не имеет значения, на каких видах инфузорий проводить биотестирование кормов. При комплексной оценке токсичности, доступной любой лаборатории, культивирование выбранных для тестирования инфузорий должно быть наименее трудоемким, как и подготовка к биоанализу, а пробоподготовка и анализ наиболее простыми и быстрыми.

Рассмотрим биотестирование кормов автоматизированным методом на инфузориях парамецциях каудатум и тетрахимене пириформис, изложенное в пункте 4.4. ГОСТ 31674-2012 (с Изменением №1). Автоматизация метода должна проводиться с целью упрощения и ускорения анализа. В этом случае биотестирование проводится в два этапа. На первом этапе при 2-часовой экспозиции определяют коэффициент выживаемости парамеций. Если он не менее 90%, пробу относят к нетоксичной, если менее 50% — к токсичной. При коэффициенте выживаемости парамеций от 90 до 50% испытание проводят на втором этапе с использованием инфузорий тетрахимена пириформис при 20–24-часовой экспозиции. Оценку токсичности определяют по коэффициенту относительного прироста инфузорий в водных экстрактах и в водных растворах ацетоновых экстрактов.

Оценка токсичности по изменению прироста численности инфузорий стилонихий при 24-часовой экспозиции в водном экстракте продукта с наличием его мелкодисперсной взвеси была использована в арбитражном методе по определению токсичности муки кормовой из рыбы еще в 1991 г. в ГОСТ 29136-91 «Мука кормовая из рыбы, морских млекопитающих, ракообразных и беспозвоночных. Метод определения токсичности». В методе определения токсичности зерна фуражного, продуктов его переработки

и комбикормов (ГОСТ 13496.7-92 разработчики перешли на более экспрессную оценку токсичности при 1-часовой экспозиции инфузорий стилонихий в водных растворах ацетоновых экстрактов, так как производителям и потребителям комбикормов требовался экспрессный часовой метод.

Прошло более 30 лет с момента введения в действие ГОСТ 13496.7-92 и 12 лет (в 2013 г.), как принят ГОСТ 31674-2012 (в 2017 г. внесены Изменения №1), с включением автоматизированного метода на инфузориях, который кроме усложнения и увеличения времени биоанализа ничего нового не дал. Чтобы доказать это, достаточно обратиться к отзывам об использовании экспресс-метода на инфузориях стилонихиях, более простого в исполнении и более быстрого (2-часового). Так, в отзыве совхоза «Пермский» от 19.03.1997 г. №0001/3-186 сообщается, что слаботоксичные корма, выявленные методом на инфузориях стилонихиях (выживаемость ниже 90%), подтверждают токсичность на поголовье свиней: при скармливании этих партий кормов свиноматкам и поросятам у них снизилась поедаемость, возникла рвота и гастроэнтериты. При потреблении таких кормов в течение недели и выше начался массовый падеж поросят и abortionы у свиноматок. Данный экспресс-метод позволяет в течение 1,5–2 часов определить токсичность комбикормов и принять меры по предупреждению скармливания слаботоксичных кормов животным. Совпадение результатов по токсичности кормов, полученных на инфузориях стилонихиях, с клинической картиной на поросятах и свиноматках достигает 90%.

В мае 1998 г. в отзыве Кинешемской птицефабрики также сообщается: слаботоксичные корма, выявленные на инфузориях стилонихиях, подтверждают токсичность на птице: наблюдаются расстройства со стороны желудочно-кишечного тракта — энтериты, перитониты, а также снижение яичной продуктивности. Совпадение результатов по токсичности комбикормов, полученных на инфузориях стилонихиях, с клинической картиной на курах и ремонтном молодняке составляет 90%. Экспресс-метод определения токсичности комбикормов на инфузориях стилонихиях наиболее приемлем для птицеводческих предприятий и комбикормовых заводов.

Использование экспресс-методов при комплексном определении токсичности комбикормов ограничено в двух случаях: когда тестирование идет с применением ацетонового экстракта престартерного и стартерного комбикорма для телят и поросят, содержащего ароматизаторы, и когда применяются водные экстракты комбикорма для свиней, содержащего подкислители (органические кислоты). И в одном и в другом случае методы дают псевдотоксический эффект.

Этот недостаток можно устранить на свинокомплексах, так как в их производственных лабораториях работают с инфузориями. Для этого на свежих стартерных кормах

с ароматизатором, определенных по свиноводческим показателям как нетоксичные (хорошего качества), необходимо отработать контрольную дозировку, то есть максимальную, при которой еще не происходит гибели инфузорий (ЛКО). Этого можно достичь путем снижения дозировки ацетонового экстракта в водной среде, уменьшая объем отобранных экстракта и увеличивая объем водной среды. Найденная концентрация ацетонового экстракта в водной среде будет рабочей для данного вида комбикорма. Проблема псевдотоксического эффекта при тестировании водных экстрактов комбикорма для свиней, содержащего подкислители, была решена в 2017 г. с внесением Изменения №1 в ГОСТ 31674-2012: время экспозиции инфузорий в водном экстракте с 3 часов было изменено на 1 час (пункт 4.1.3.). При 3-часовой экспозиции наличие органических кислот в комбикормах вызывало гибель инфузорий в интервале 1,5–2 часов. Однако биотестирование кормов автоматизированным методом на инфузориях при более длительной экспозиции (пункт 4.4.) может показать их токсичность.

В заключение необходимо остановиться на перспективах развития токсикологических исследований комбикормов и комбикормового сырья. В 1998 г. в лаборатории прикладной физиологии и токсикологии ВНИРО автор данной статьи участвовал в апробации автоматизированного метода определения токсичности по ингибиции ацетилхолинэстеразы, разработанного одним из российских

университетов. Данный фермент осаждался на мембранный фильтр и при воздействии раствора, содержащего токсины, происходило его ингибирирование, которое через систему датчиков регистрировалось на цифровом дисплее. Проводилось испытание водных растворов ацетоновых экстрактов комбикормов, определенных на инфузориях стилонихиях как нетоксичные, слаботоксичные и токсичные. Ингибирирование ацетилхолинэстеразы, отображенное на цифровом дисплее в процентах, соответствовало проценту выживаемости инфузорий стилонихий. Продолжительность определения составляла две минуты. В медицинской токсикологии воздействие токсических веществ на организм человека давно выявляется по ингибиции ацетилхолинэстеразы. Объекты сельскохозяйственного выращивания, так же как организм человека, содержат фермент ацетилхолинэстеразу.

В статье прослеживается историческое развитие токсикологии комбикормов, которое началось в 1944 г. на теплокровном организме — кролике, в 1992 г. продолжилось на одноклеточном организме — инфузории, а в дальнейшей перспективе должно происходить на ферментном уровне по ингибиции ацетилхолинэстеразы. Регуляторам отрасли необходимо ориентироваться на развитие этого уровня, требующего проведения научно-исследовательских работ и финансовой поддержки. За ним будущее. ■



ИНФОРМАЦИЯ

В филиал ФГБУ «ЦОК АПК» в Республике Татарстан 1 марта 2025 г. поступили первые восемь образцов побочных продуктов животноводства (ППЖ) крупного рогатого скота. Заявитель — сельхозпредприятие Мамадышского района республики. Специалисты испытательной лаборатории приступили к исследованию образцов на соответствие установленным нормативам по массовой концентрации примесей токсичных элементов и массовой концентрации остаточных количеств пестицидов в сухом веществе. Предстоит провести 48 исследований, по итогам которых заявителю будут выданы протоколы испытаний. Лабораторным испытаниям предшествовала разработка технических условий на ППЖ на основе навоза крупного рогатого скота, которая также осуществлялась при участии

специалистов ФГБУ «ЦОК АПК». Требования к ППЖ установлены положениями ФЗ от 14.07.2022 №248 «О побочных продуктах животноводства» и Постановлением Правительства РФ от 31.10.2022 №1940 «Об утверждении требований к обращению побочных продуктов животноводства». Соблюдение указанных требований должно быть подтверждено результатами исследований, полученными в аккредитованной лаборатории. Соответствие лаборатории филиала ФГБУ «ЦОК АПК» в Республике Татарстан необходимым требованиям к проведению исследований ППЖ подтверждено экспертами Федеральной службы по аккредитации и приказом ведомства от 15.08.2024 г. Информация опубликована на сайте ФСА в реестре лиц под уникальным номером RA.RU.21ПС18.

По материалам fczerna.ru/news/

В ЕАЭС вводится единая база данных по неблагоприятным реакциям у животных на ветпрепараты. Введен в действие общий процесс по формированию, ведению и использованию в ЕАЭС единой информационной базы данных по неблагоприятным реакциям у животных, выявленным при применении ветпрепаратов. Распоряжение Коллегии ЕЭК от 24 марта 2025 г. №25 О введении в действие общего процесса «Формирование, ведение и использование единой информационной базы данных по неблагоприятным реакциям у животных, выявленным при применении ветеринарных лекарственных препаратов на территориях государств-членов Евразийского экономического союза» вступает в силу через 30 календарных дней после опубликования на сайте ЕАЭС.