

О НАЧАЛЕ ПУТИ ЭКСПРЕСС-МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ

А. ГРОЗДОВ, канд. биол. наук, ООО «АВИСАР»

В 1992 г. экспресс-метод с использованием инфузорий стилонихий был внесен в ГОСТ 13496.7-92 «Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения токсичности». Этот же метод был включен в утвержденный и введенный в действие ГОСТ 29136-91 «Мука кормовая из рыбы, морских млекопитающих, ракообразных и беспозвоночных. Метод определения токсичности». В качестве основного (арбитражного) метода в ГОСТе 29136-91 приведен метод оценки токсичности по снижению прироста численности инфузорий стилонихий в сравнении с контролем в процентах при 24-часовом действии нефилтрованного водного экстракта, содержащего мелкодисперсную взвесь кормового продукта. Ранее этот метод был разработан автором настоящей статьи для определения токсичности гранулированных комбикормов, используемых в садковом рыбоводстве. Метод прошел производственную проверку и получил положительную оценку в конце рыбоводного цикла в трех рыбоводных хозяйствах, одним из которых было Волгореченское. Прототипом данного метода послужил метод определения токсичности донных грунтов в местах сброса сточных вод различными производствами с применением инфузорий стилонихий. Метод изложен в кандидатской диссертации автора: «Токсикологическая характеристика некоторых видов зоопланктона в связи с биотестированием сточных вод и загрязняющих веществ». Производственная проверка 24-часового метода определения токсичности рыбных гранулированных комбикормов

в Волгореченском рыбхозе в 1988 г. послужила отправной точкой для создания экспресс-метода определения токсичности комбикормов для садкового рыбоводства с использованием их водных растворов ацетоновых экстрактов и с экспозицией инфузорий в течение одного часа. На этом хотелось бы остановиться подробнее.

Волгореченский рыбхоз выращивал товарную рыбу (каarp, форель, осетровые) в проточных садках в течение всего года на теплых водах, поступающих с Костромской ГРЭС. Потребление корма было высоким, все его партии проверялись на наличие токсичности на рыбах гуппи. Исходя из своей практики, рыбоводы полностью доверяли данному методу. Разработан он был во ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (ВНИИВСГЭ) Курмановым И.А. и утвержден ГУВ МСХ СССР 4 июня 1980 г. Метод основан на введении концентрированного ацетонового экстракта корма в банку с водой, в которую помещают пять рыбок гуппи. Степень токсичности корма определяют по количеству погибших рыбок через 24 ч экспозиции. Он работает на совместном действии всех присутствующих токсинов и уникален по подбору тест-организма: токсины поступают сразу в кровь рыбок через жабры и разносятся во все органы и ткани, минуя пищеварительную систему, в результате чего достигается быстрота ответной реакции всего организма — через 24 ч. При непосредственном кормлении рыбок гуппи токсичными кормами ни одна не погибла, так как у них мощная система пищевой детоксикации, которая, к сожалению, пока никем не изучена.

В Волгореченском рыбхозе нами была предпринята попытка реализовать метод определения токсичности на рыбах гуппи в приложении к другому тест-объекту — инфузориям стилонихиям. Для этого использовались рыбные корма с различными сроками хранения: свежие, находившиеся на хранении и с законченным сроком годности. На рыбах гуппи они были определены как нетоксичные, слабotoксичные и токсичные, соответственно. Основной задачей при отработке экспресс-метода являлась практическая «привязка» инфузорий к рыбкам гуппи на комбикормах, которые показали на рыбах отсутствие токсичности. Для этого практическим путем на нетоксичных кормах была подобрана концентрация водного раствора ацетонового экстракта, которая не вызывала гибели инфузорий (ЛКо). При увеличении концентрации фиксировалась гибель инфузорий, причем в течение часа. С увеличением времени экспозиции более одного часа гибель инфузорий не возрастала. При установленной концентрации водного раствора ацетонового экстракта далее тестировались на инфузориях корма, показавшие на рыбах гуппи слабую токсичность и токсичность. Выживаемость стилонихий составила соответственно около 60% и 10%, а время, за которое происходила их гибель, также было равно одному часу. Это время оказалось характерным для динамики токсического действия подобранной концентрации — 0,5 мл ацетонового экстракта, извлеченного из 10 г мелкоизмельченного корма, на 50 мл водной среды, и оно стало временем экспозиции для инфузо-

рий стилонихий при определении токсичности комбикорма. Перед тестированием приготовленные водные растворы ацетоновых экстрактов фильтровались через бумажный фильтр для удаления из них жира, создающего пленку на поверхности водной среды. При этом мелкодисперсный взвешенный жир, соответствующий по размерам пищевым частицам для инфузорий, придавал белесый цвет раствору, мутность которого зависела от содержания жира в пробе. С увеличением объема исследований комбикормов различной степени токсичности была разработана шкала оценки токсичности по проценту выживаемости инфузорий, которая дана в схеме определения токсичности в предыдущем номере журнала (№4-2021).

Результаты работы в Волгореченском рыбхозе в дальнейшем легли в основу заявки на изобретение от 14.04.1992, и в 1995 г. был получен Патент №2049994 на изобретение «Способ оценки качества кормовых и пищевых продуктов» (авторы: Гроздов А.О. и Цвылëв О.П.).

Расширению использования экспресс-метода на другие виды комбикормов и сырья способствовали специалисты производственной лаборатории одного из крупнейших свиноводческих комплексов страны — совхоза (поголовье 160 тыс. свиней). После публикации статьи об экспресс-методе в 1989 г. к нам обратилась ветеринарный врач-токсиколог этого совхоза Дорофеева Ф.Г. с просьбой разработать экспресс-метод определения токсичности комбикормов для свиней. Экспресс-метод мог помочь решить проблему сохранности молодняка. На свинокомплексе токсичность комбикормов определяли по ГОСТ 13496.7-87 «Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения токсичности» на белых мышах по воспалительной реакции при подкожном введении им ацетоновых экстрактов (метод кож-

ной пробы на кроликах был оставлен только для определения токсичности зерна фуражного и продуктов его переработки). Поскольку метод на белых мышах не выявлял токсичность комбикормов для свиней, ее определяли методом кожной пробы на кроликах, который показывал высокую (85%) сходимость с клинической картиной, полученной на свиньях. Однако из-за длительности биоанализа на кроликах, который составлял семь дней, этот метод не способствовал предотвращению отхода поросят и абортированного опороса свиноматок, он только давал объяснение причин ущерба. Свиноводству был крайне необходим часовой экспресс-метод, который объективно бы выявлял бы токсичность комбикормов.

Экспресс-метод определения токсичности кормов для свиней был разработан за четыре месяца, в течение которых из совхоза «Пермский» оперативно поступали на исследования образцы комбикормов для поросят и свиноматок (всего 60 шт.). Комбикорма были определены по кожной пробе на кроликах как нетоксичные и слаботоксичные, с различной степенью гиперемии, что подтверждалось клинической картиной на свиньях. Рабочую концентрацию водных растворов ацетоновых экстрактов для данных видов кормов установили аналогичным способом, что и для рыбных кормов. Она составила 0,5 мл ацетонового экстракта, извлеченного из 10 г мелкоизмельченного корма, на 40 мл водной среды, то есть это 1%-ный раствор. При выживаемости инфузорий ниже 90% те же корма по кожной пробе на кроликах показали слабую токсичность. Степень токсичности кормов, определяемой по выживаемости инфузорий, была проранжирована по кожной пробе на кроликах как единственного арбитражного метода, применяемого в течение многих лет (исключением является метод, описанный в ГОСТ 13496.7-87).

Слабая токсичность корма, выявленная на инфузориях стилонихиях,

подтвердилась на поголовье свиней: у свиноматок и поросят наблюдались снижение поедаемости корма, рвота, гастроэнтериты. Потребление таких кормов в течение недели и больше приводило к массовому падежу поросят и абортам у свиноматок. Совпадение результатов по токсичности комбикормов, полученных на инфузориях стилонихиях, с клинической картиной на поросятах и свиноматках достигает 90%, с кожной пробой на кроликах — 85%. Более высокое совпадение результатов экспресс-метода со свиноводческими показателями объясняется тем, что кожная проба на кроликах реагирует только на действие микотоксинов дермoneкротического действия, а инфузории регистрируют действие токсинов более широкого спектра.

В совхоз «Пермский» комбикорма поступали с расположенного вблизи Краснокамского комбикормового завода и скармливались не позднее недели со дня производства, то есть корма были неокисленные. Токсичность свежих комбикормов обуславливалась в основном присутствием микотоксинов, что подтверждалось высоким (85%) совпадением результатов кожной пробы на кроликах со свиноводческими показателями. Позднее автору поступали сообщения с некоторых свиноводческих хозяйств, которые использовали комбикорма с незаконченным сроком годности, но определенные экспресс-методом как слаботоксичные (выживаемость инфузорий составляла 70%). На фоне скармливания этих кормов происходил массовый падеж поросят, при этом токсичность не подтверждалась арбитражным методом кожной пробы на кроликах (он был единственным арбитражным методом до 2005 г.), а кислотное число жира составляло около 26 мг КОН.

С 14 марта 1990 г. совхоз «Пермский» начал проводить биотестирование поступающих кормов экспресс-методом на инфузориях стилонихиях,

при этом слаботоксичных кормов было выявлено 10,2%. По итогам 1990 г. был произведен расчет ожидаемого экономического эффекта при использовании экспресс-метода определения токсичности комбикормов для свиней на инфузориях, полученного за счет предотвращенного ущерба от скармливания слаботоксичных кормов. Расчет основывался на показателе сохранности молодняка, который мог быть выращен и сдан на мясокомбинат. Экономический эффект составил 835,9 тыс. руб. в год в ценах 1990 г. В том же году совхоз «Пермский» обратился с письмом в отдел стандартизации в пищевой, легкой промышленности и сельском хозяйстве Госстандарта СССР о необходимости пересмотра ГОСТ 13496.7-87 с включением в следующий ГОСТ экспресс-метода определения токсичности комбикормов. Реакция Госстандарта оказалась быстрой и через месяц было проведено совещание, на котором установили порядок проведения производственных проверок. Создание экспресс-метода по определению токсичности кормов для свиней являлось внеплановой работой без привлечения госфинансирования, поэтому метод прошел тщательную проверку в девяти организациях страны: Республиканской производственной лаборатории комбикормовой промышленности

(РПЛКП) Минхлебопродуктов Белорусской ССР, РПЛКП Минхлебопродуктов Молдавской ССР, РПЛ госхлебинспекции Минхлебопродуктов РСФСР, Областной ветеринарной лаборатории Ростовского Агропромсоюза, Ростовской областной проектно-изыскательской станции химизации сельского хозяйства Госагропрома РСФСР, на Раменском комбинате хлебопродуктов, в совхозе «Пермский», на птицефабрике «Томилинская». Последняя производственная проверка проводилась в начале 1992 г. во ВНИИ комбикормовой промышленности, организованная Техническим комитетом по стандартизации ТК4 «Корма, комбикорма, кормовые добавки», который рассматривал вопрос о внесении метода определения токсичности на инфузориях стилонихиях в качестве предварительного ускоренного метода в ГОСТ 13496.7-92 «Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения токсичности». Для этого в течение одного дня экспресс-методом на инфузориях стилонихиях определяли токсичность комбикормов и сырья (всего 18 образцов), результаты тестирования сравнивали с результатами, полученными ранее методом кожной пробы на кроликах (основной, арбитражный). Совпадение результатов основного и экспрессного

методов составляло 80%. Несовпадение в 20% было обусловлено тем, что экспресс-методом токсичность выявлялась, а основным — нет. Это легко объяснимо. Как уже упоминалось выше, метод кожной пробы на кроликах регистрирует наличие только микотоксинов дермонекротического действия, а экспресс-метод на инфузориях регистрирует совокупное действие всех токсинов, которые поступают в организм-клетку в растворенном виде через клеточную оболочку и с мелкодисперсной взвесью продукта через клеточный рот инфузорий в пищеварительную вакуоль.

На основании комплексной производственной проверки, которая показала высокую сходимость (до 90%) с объектами выращивания (свиньи, птица), а также с арбитражным методом кожной пробы на кроликах (80%), решением Технического комитета по стандартизации ТК4 экспресс-метод на инфузориях стилонихиях был внесен в ГОСТ 13496.7-92 «Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения токсичности». В 1993 г. ГОСТ 13496.7-92 был утвержден и введен в действие.

О дальнейшей работе автора по совершенствованию и упрощению экспресс-метода с использованием инфузорий парамеций будет сообщено в следующем номере. ■



ИНФОРМАЦИЯ

В Москве состоялось открытие крупного лабораторного сельскохозяйственного кластера АО «Агроплем», специализирующегося на молекулярно-генетической экспертизе, контроле качества молока, кормов и кормового сырья, ветеринарной диагностике и анализе почв. В мероприятии приняли участие первый заместитель министра сельского хозяйства России Джамбулат Хатуов, представители федеральных органов власти, руководители отраслевых научно-исследовательских институтов и союзов, бизнеса. Мощности нового кластера позволяют ежедневно исследовать около 10 тыс. проб молока,

до 1 тыс. проб почв и более 500 проб кормов и сырья для их производства, также свыше 500 проб в день смогут анализировать в лаборатории молекулярно-генетической экспертизы. Таким образом, запуск проекта дает возможность сельхозтоваропроизводителям получить полный комплекс лабораторных услуг. Большинство сотрудников кластера — выпускники МСХА имени К.А. Тимирязева. По словам Джамбулата Хатуова, работа кластера высокого уровня придаст новый импульс развитию отрасли.

По материалам mcs.gov.ru/press-service/news/v-