

**ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ КОНСОРЦИУМА ВЫДЕЛЕННЫХ
ИЗ ПРИРОДНЫХ БИОТОПОВ МИКРООРГАНИЗМОВ-
АНТАГОНИСТОВ МИКРОМИЦЕТОВ**

Хабирова С.Р.¹, Идиятов И.И.², Шуралев Э.А.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия,

²Федеральный центр токсикологической, радиационной

и биологической безопасности, г. Казань, Россия

E-mail: galliamova95@mail.ru

Резюме: В данной статье приведены результаты токсикологической оценки консорциума микроорганизмов – антагонистов токсигенных микромицетов, состоящего из молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* и фенотипически различающихся штаммов вида *Bacillus subtilis*, выделенных из различных биотопов Республики Татарстан. Целью работы явилось определение острой токсичности и кумулятивного эффекта от перорального введения суспензии указанных выше микроорганизмов, смешанных в равных соотношениях, суммарным титром 1×10^{12} КОЕ/мл. По результатам изучения острой токсичности суспензии штаммов при однократном введении в максимально возможном объеме из расчета 2мл / 100г массы тела установить полулетальную дозу не удалось, гибели подопытных животных и каких-либо токсических эффектов отмечено не было. При многократных введениях суспензии микроорганизмов суммарным объемом 166,32 мл/кг массы тела коэффициент кумуляции составил 8,32, гибели животных, расстройств физиологических функций, нарушений морфологии органов не установлено, что свидетельствует об отсутствии кумулятивного действия у содержащихся в ней микроорганизмов, их метаболитов и веществ культуральной жидкости.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, бациллы, консорциум, острая токсичность, кумуляция.

**SAFETY ASSESSMENT OF A CONSORTIUM OF MICRO-MYCET
ANTAGONIST MICROORGANISMS ISOLATED FROM NATURAL BIOTOPES**

Khabirova S.R.¹, Idiyatov I.I.², Shuralev E.A.¹

¹Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia,

²Federal center for Toxicological, radiation and biological safety, Kazan, Russia

E-mail: galliamova95@mail.ru

Summary: This article presents the results of a toxicological assessment of a consortium of microorganisms - antagonists of toxigenic micromycetes, consisting of lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* and phenotypically different strains of the species *Bacillus subtilis* isolated from various biotopes of the Republic of Tatarstan. The aim of the work was to determine the acute toxicity and cumulative effect of oral administration of a suspension of the above microorganisms, mixed in equal proportions, with a total titer of 1×10^{12} CFU/mL. According to the results of studying the acute toxicity of the suspension of strains with a single administration in the maximum possible volume at the rate of 2 mL per 100 g of body weight, a half-lethal dose could not be determined, the death of experimental animals and no toxic effects were noted. With multiple injections of a suspension of microorganisms with a total volume of 166.32 ml / kg body weight, the cumulation coefficient was 8.32, animal deaths, disorders of physiological functions, and violations of organ morphology were not established, which indi-

cates the absence of cumulative action in the microorganisms contained in it, their metabolites and substances of the culture fluid.

Key words: lactic acid bacteria, bacilli, consortium, acute toxicity, cumulation.

Введение

На сегодняшний день существует широкий ассортимент кормов для сельскохозяйственных животных, их состав имеет немаловажную роль для производителя и потребителя [1]. Для обеспечения безопасности в агропродовольственной цепочке производители кормов должны контролировать все сырье и продукцию на предмет наличия возможных загрязнений [2]. При этом микотоксины являются основным и наиболее распространенным загрязнителем кормов. Производители кормов должны следить за тем, чтобы концентрации этих загрязняющих веществ не превышали максимально допустимых значений. Наличие микотоксинов в кормах и продуктах питания – глобальная проблема, сопровождающаяся ростом заболеваемости у животных и человека, а также огромными финансовыми потерями в пищевой промышленности и кормопроизводстве [3, 4].

Различные методы используются для обеззараживания загрязненных микотоксинами кормов, но не все способы подходят для производителей кормов. Это связано с тем, что эффективный метод восстановления корма от микотоксинов должен быть способен удалять или инактивировать микотоксины без образования токсичных остатков и влияния на технологические свойства, пищевую ценность и вкусовые качества продуктов [5].

Одним из наиболее эффективных способов обработки корма, загрязненного токсинотрофными грибами и профилактики микотоксикозов у животных является применение антагонистов микромицетов, способных к детоксикации корма. При этом штаммы микроорганизмов, применяемые для этих целей, разумеется должны быть безопасными. В связи с этим целью настоящей работы явилась токсикологическая оценка отобранных ранее микроорганизмов, показавших активность против токсигенных микроскопических грибов.

Материалы и методы

Объектом исследований служили микроорганизмы – антагонисты микромицетов *Fusarium sporotrichioides* и *Aspergillus flavus*, выделенные из природных биотопов Республики Татарстан: штаммы молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* (условно обозначенные М3 и М14), *Lactococcus lactis* (С4, С5 и Е8) [6, 7] и фенотипически различающиеся штаммы вида *Bacillus subtilis* (СБ10, СБ15 и СБ16) [8]. Молочнокислые бактерии культивировали на модифицированной сывороточной среде в течение 20 часов в условиях термостата при температуре 30 °С, *B. subtilis* - на мясо-пептонном бульоне в течение 24 часов при температуре 37 °С. Концентрацию микробных клеток в суспензиях устанавливали методом высева последовательных серийных десятикратных разведений на плотные питательные среды (молочнокислые - на среду MRS, *B. subtilis* - мясо-пептонный агар) с последующим подсчетом выросших колоний [6]. Для формирования консорциума суспензии штаммов смешивали в равных соотношениях до получения суммарного титра 1×10^{12} КОЕ/мл.

Безопасность консорциума микроорганизмов оценивали по результатам изучения острой токсичности и выявления кумулятивного действия [9, 10]. Безвредность штаммов, отсутствие токсичности, вирулентности и токсигенности будут установлены в последующих опытах на белых мышах и крысах.

Исследование острой токсичности проводили в опыте на самках белых крыс живой

массой 150 - 160 г., в возрасте 10-12 недель, разделенных на 2 группы по 10 голов в каждой. Животные находились в одинаковых условиях содержания, соответствующих зооигиеническим нормам (температуре окружающей среды 15-18 °С и относительной влажности воздуха 50-65%), имели свободный доступ к кормам согласно суточным нормам, водопой был без ограничений. Чистку клеток осуществляли ежедневно. Время адаптации перед началом эксперимента составляло 14 дней. В ночь перед опытом крыс выдерживали на голодной диете. Наутро проводили взвешивание животных и пероральное введение при помощи атравматического зонда крысам первой группы - консорциума микроорганизмов в виде суспензии с титром 1×10^{12} КОЕ/мл из расчета 2 мл/100 г живой массы [11], животным второй группы - изотонического раствора натрия хлорида в том же объеме. Критериями оценки токсичности служили клиническое состояние и выживаемость животных в течение 48 часов и 14 суток эксперимента [9 - 14].

Кумулятивное действие консорциума изучили по методике Lim R. и соавторов [15]. Опыты проводили на 10 белых крысах обоего пола, живой массой 190-200 г. Суспензию микроорганизмов, полученную по схеме, приведенной выше, вводили животным внутривенно в объеме 1 - 4 мл в зависимости от живой массы и периода введения. Начальная доза составляла 1/10 от максимально вводимой (2 мл/100 г живой массы), в каждые последующие 4 дня дозу увеличивали в 1,5 раза. Наблюдение за подопытными животными вели ежедневно на протяжении всего периода опыта.

Результаты и их обсуждение

Одним из критерием безопасности при фармакотоксикологической оценке любых препаратов и веществ является отсутствие токсического действия при введении в однократной и многократных дозах, которое может выражаться в расстройстве физиологических функций, нарушении морфологии органов, а также гибели экспериментальных животных.

Под острой токсичностью понимают установление возможного вредного действия испытуемого вещества, проявляющегося после его однократного применения. Целью изучения острой токсичности является определение переносимых, токсических, летальных доз и причин наступления гибели животных.

Так, при изучении острой токсичности консорциума было установлено, что однократное пероральное введение лабораторным животным суспензии микроорганизмов с титром 1×10^{12} КОЕ/мл в максимально допустимом объеме (2 мл/100 г массы тела) не вызывало появления у них клинической картины интоксикации и гибели (табл. 1).

Таблица 1

Результаты определения острой токсичности консорциума микроорганизмов

Группа	Кол-во животных в группе	Пало, гол.	Выжило, гол.
опыт	6	0	6
контроль	6	0	6

На протяжении всего эксперимента общее клиническое состояние животных опытной группы не имело отличий с контролем, аппетит был хорошо выражен, крысы были активными, реакция на внешние раздражители сохранена. Нарушений функциональной активности органов пищеварительной и мочевыделительной систем не выявлено.

Некоторые препараты и вещества при продолжительном приеме в небольших дозах способны вызывать токсический эффект, что называется кумулятивным действием. Схема оценки кумулятивного действия консорциума приведена в таблице 2.

**Схема оценки степени кумуляции консорциума микроорганизмов
суммарным титром 1×10^{12} КОЕ/мл**

Сроки введения, сут	Суточная доза, мл/кг массы тела	Суммарная доза за 4 дня, мл/кг м.т.	Суммарная доза по периодам введения, мл/кг м.т.	Количество павших животных, гол
1-4	2,00	8,00	8,00	0
5-8	3,00	12,00	20,00	0
9-12	4,50	18,00	38,00	0
13-16	6,75	27,00	65,00	0
17-20	10,13	40,52	105,52	0
21-24	15,20	60,80	166,32	0

Степень кумулятивного действия выражают коэффициентом кумуляции ($K_{кум}$), который представляет собой отношение суммарной дозы вещества, вызывающей интоксикацию или гибель у 50% подопытных животных при многократном введении к дозе, вызывающей тот же эффект у 50% животных при однократном введении. Исходя из этого, по способности к кумуляции вещества подразделяют на сверхкумулятивные ($K_{кум} < 1$), с выраженной кумуляцией (от 1 до 3), с умеренной кумуляцией (от 3 до 5) и со слабовыраженной кумуляцией ($K_{кум} > 5$).

В течение 24 суток опыта и последующих 2-х недель наблюдения падежа, изменений в клиническом состоянии животных, понижения аппетита, взъерошенности шерстного покрова отмечено не было, реакция на внешние раздражители была сохранена. По окончании эксперимента провели эвтаназию и вскрытие подопытных крыс, макроскопическое исследование внутренних органов не выявило отличий с интактными животными (рис. 1). Трупы имели правильное телосложение, среднюю упитанность, естественные отверстия: рот – закрыт, язык находился в ротовой полости, слизистая оболочка губ, десен были бледно-розовые, гладкие, блестящие; носовые отверстия – слизистая бледно-розовая, сухая, истечений отмечено не было, проходимость хорошая; ушные раковины без изменений, наружный слуховой проход чистый; анус – закрыт, слизистая оболочка бледно-розовая. Шерсть удерживалась хорошо, шерстный покров был блестящим, кожа – эластичной, подкожная клетчатка хорошо выражена. Мышцы красноватого цвета, хорошо развиты, волокнистость на разрезе выражена, сухожилия и связки белого цвета, эластичные, прочные. Конфигурация костей и суставов не нарушена. Кости твердые, ножом режутся с трудом, поверхность гладкая, блестящая. Надкостница серовато-белого цвета, влажная, блестящая. Целостность зубов не нарушена. Слизистая оболочка щек, десен, твердого и мягкого неба бледно-розовая, влажная, гладкая, блестящая. Положение органов грудной и брюшной полостей: анатомически правильное. Жидкости в грудной и брюшной полостях отмечено не было. Прходимость глотки и пищевода не нарушена, слизистая оболочка серо-розовая, влажная, гладкая, блестящая. Сердце в объеме не изменено. В полостях сердца содержалось незначительное количество не свернувшейся крови, эндокард гладкий, блестящий. Миокард дрябловатый, красного цвета. Легкие бледно-розового цвета, равномерно окрашенные, без признаков отека, дольчатость выражена хорошо, упругой консистенции. Селезенка не увеличена в объеме, края острые, продолговатой формы, упругой консистенции, красно-коричневого цвета. Печень не увеличена в размере, края острые, форма не изменена, консистенция упругая, цвет вишневый. Желчь густая, темно-зеленого цвета, слизистая оболочка желчного пузыря гладкая, блестящая. Желудок заполнен кормовыми массами серого цвета, однородной консистенции. Слизистая оболочка желудка бледно-розового цвета. Слизистая оболочка тонкого и толстого отделов кишечника сероватого оттенка. Почка бобовидной формы, темно-коричневого цвета, в околопочечной клетчатке содержится умеренное количество жира, капсула отделяется легко, граница между корковой и мозговой зонами выражена.

Мочевой пузырь пустой или переполнен мочой светло-желтого цвета, слизистая оболочка бледно-розового цвета. Половые органы без отклонений. У самцов семенники упругой консистенции, находятся в полости мошонки, имеют эллиптическую форму. У самок яичники и матка в норме. Головной мозг не отечен, дольчатость выражена хорошо, мозговое вещество упругой консистенции, без кровоизлияний.



Рисунок 1. Патологоанатомическое вскрытие лабораторных животных

Так как в ходе острого опыта не была определена среднесмертельная доза консорциума и не происходило гибели животных в результате многократных введений, коэффициент кумуляции определяли по формуле:

$K_{\text{кум}} = \text{общая суммарная доза} / \text{максимально вводимая доза}$

При этом коэффициент кумуляции испытуемого консорциума с суммарным титром 1×10^{12} КОЕ/мл составил 8,32 (166,32 мл/кг м.т. / 20,00 мл/кг м.т.), что свидетельствует об отсутствии кумулятивного действия у содержащихся в нем микроорганизмов, их метаболитов и веществ культуральной жидкости (так как $K_{\text{кум}}$ больше 5).

Заключение

Таким образом, на основании проведенных экспериментов определить полулетальную дозу (ЛД₅₀) консорциума микроорганизмов с титром 1×10^{12} КОЕ/мл не удалось, лабораторные животные переносят его введение без видимых последствий в максимально вводимом объеме, из чего следует отнести его к малотоксичным. При продолжительном приеме в небольших дозах каких-либо токсических эффектов отмечено не было, кумулятивного действия не установлено.

Финансирование исследования

Работа выполнена при поддержке Совета по грантам Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых и по государственной поддержке ведущих научных школ РФ в рамках выполнения гранта МК-1582.2020.11.

Библиографический список

1. Radmilo, Colovic et al. Decontamination of Mycotoxin – Contaminated Feedstuffs and Compound // Toxin (Basel). – 2019. – Vol.11, N 11. – P.617.
1. Park B. International regulatory issues on animal feed additives: Impact on consumer safety and related – industry // J.Anim. Sci. – 2018. – N 96. – P.1-2.
2. Martin David Rose EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Sci-

entific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed // EFSA J. – 2011. – Vol.9, N12. – P.2481.

3. Pinotti L. et. al. Mycotoxin Contamination in the EU Feed Supply Chain: A Focus on Cereal Byproducts // Toxins. – 2016. – N 8. – P. 45.

4. Pankaj S.K. et al. A review of novel physical and chemical decontamination technologies for aflatoxin in food // Trends Food Sci. Technol. – 2018. – N71. – P. 73-83.

5. Хабирова (Галлямова) С.Р. и др. Оценка безопасности выделенных из природных биотопов молочнокислых бактерий путем биотестирования на простейших и культуре клеток // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2020. – № 1(33). – С. 67-72.

6. Идиятов И.И. и др. Оценка воздействия пробиотических штаммов на инфузорий // Ветеринарный врач. – 2020. – №3. – С.21-27.

7. Идиятов И.И. и др. Поиск антагонистов микромицета *Fusarium sporotrichioides* // Аграрный Вестник Урала. – 2018. – №3(170). – С.10-20.

8. Острая токсичность в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств // Под ред. Миронова А.Н., Бунатян Н.Д. и др. – ЗАО «Гриф и К». – 2012.

9. ГОСТ 32644-2014. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность - метод определения класса острой токсичности: дата введения 2015-06-01. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200115815>

10. СТП-14.621.21.0008.07-2015. Методика определения острой токсичности при пероральном введении. – 2015. – 19с.

11. Иванов В.В., Денисенко О.Н. Определение острой токсичности и желчегонной активности экстракта горца сахалинского //Международный журнал экспериментального образования. – 2016. – №5. – С.97-99.

12. OECD, Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing, OECD Series on Testing and Assessment, No. 24, OECD Publishing, Paris. – 2002. – URL: <https://doi.org/10.1787/9789264078413-en>.

13. OECD, Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. - OECD Publishing, Paris. – 2002. – URL: <https://doi.org/10.1787/9789264070943-en>.

14. Lim R.R. et al. A method for the evaluation of cumulation and tolerance by the determination of acute and subchronic median effective doses // Arch. Intern. Pharm. Ther. – 1961. – V.130. – P.336-352.

УДК 633.52. 631.86

ОСОБЕННОСТИ ВОЗДЕЛЫВАНИЯ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО В БИОЛОГИЧЕСКОМ ЗЕМЛЕДЕЛИИ

*Ханиева И.М., Одижев А.А., Хакулов И.В., Забаков А.Б.,
ФГБОУ ВО Кабардино-Балкарский ГАУ*

Резюме: в статье приводятся данные результатов исследований применения биопрепаратов и макроудобрений на посевах льна масличного сортов Ручеек, ВНИИМК 620, ВНИИМК 630.

Ключевые слова: лен масличный, сорта, продуктивность, биологическое земледелие макроудобрения, биопрепараты.