

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
«Южный федеральный университет»

«УТВЕРЖДАЮ»

д.б.н. В.А. Чистяков

« ____ » _____ 2017 г.

ОТЧЁТ

на тему:

Проведение экспериментов по тестированию токсичности и генотоксичности образцов кормов и компонентов кормов для выращивания кур, используемых в проекте РНФ № 16-16-04032, отобранных в апреле и мае 2017 г.

Соглашение РНФ № 16-16-04032 от 11.08.2016 г (вн. № 213.01-03/2016-9) по научному проекту «Замедление репродуктивного старения кур с помощью культур пробиотических микроорганизмов – продуцентов веществ с антиоксидантной и ДНК-протекторной активностью»

Руководитель: д.б.н., В.А. Чистяков

Исполнитель: член-корр. РАН, д.м.н., А.В. Тутельян

Ростов-на-Дону

2017г.

В ходе предыдущего этапа проекта был применен комплекс методов с использованием LUX-биосенсоров на основе *E. coli* и теста Эймса (*Salmonella*/микросомы). Для метаболической активации промутагенов использовали S9 фракцию гомогената печени кур, полученную по оптимизированному в ходе настоящих исследований протоколу.

Материалы и методы

Экстракцию потенциальных генотоксинов проводили по методу [1]. Тестирование на биосенсорных штаммах *E. coli* MG1655 с плазмидами pRecA-lux (реагирует на повреждение ДНК), pKatG-lux (реагирует на генерацию перекиси водорода), pSoxS-lux (реагирует на супероксид-анион-радикал) и pXen7-lux (индикатор неспецифической токсичности) [1] проводили по методу [2]. Мутагенную активность определяли по методу [3].

Метод получения препарата S-9 для метаболической активации промутагенов в ходе мониторинга качества корма.

Кур используемого в проекте кросса Хайсекс-Браун возраста 133 дня веса 1,8 – 2,0 кг декапитировали, кровь сливали, тушки немедленно вскрывали, извлекали печень, промывали стерильным 0,1 М KCl и помещали на лед. Затем печень гомогенизировали в стальном механическом гомогенизаторе (MPW-302, Польша) в течение 2-х минут при скорости 2000 об/мин (предварительная гомогенизация) с последующей гомогенизацией в гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком в 9 объемах 0,15 М NaCl. Все операции гомогенизации также проводили на льду. Выделение микросомальной фракции проводили с помощью дифференциального центрифугирования по стандартной методике [4]. Содержание белка в препарате доводили до 10 мг/мл, разбавляя буфером для гомогенизации с добавлением 3% глицерина. Готовый препарат хранили при -20°C с добавлением глицерина до концентрации 30%.

В качестве стандартного промутагена, требующего контроля

метаболической активации, использовались разведения 2-аминоантрацена в концентрациях 5, 10 и 50 мкг/мл в DMSO. В качестве отрицательного контроля на чашку вносили DMSO.

Результаты и их обсуждение

Оценка генотоксичности, токсичности и мутагенности образцов корма и кормовой добавки, отобранных в апреле и мае 2017 г.

Генотоксичность.

Тестирование токсичности и генотоксичности образцов корма (экстракта корма и кормовой добавки) показало, что образцы корма и использованной для его обогащения кормовой добавки, содержащей препараты на основе пробиотических бактерий В-1895 и КАТМІРА 1933, не демонстрируют токсических, генотоксических и прооксидантных эффектов. При действии образца добавки подавления жизнедеятельности биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 рХен7-lux не наблюдалось. Для остальных штаммов при действии обоих образцов эффект также был нулевым.

Мутагенность.

Оценку мутагенности корма проводили по методике, модифицированной с учетом полученных данных.

Опыт ставили в трех повторностях. На чашку вносили 50 мкл суточной культуры ТА100 и 50 мкл спиртового экстракта образца корма. В качестве отрицательного контроля использовали DMSO, в качестве положительного - 2-аминоантрацен в концентрации 1 мкг/чашку.

Результаты представлены в таблице 2. При действии спиртового экстракта корма не наблюдалось статистически достоверного усиления уровня мутагенеза, тогда как положительный контроль демонстрировал обычное для данного теста усиление уровня мутагенеза.

Таблица 2. Мониторинг мутагенности корма, тест Эймса на штаммах TA98 и TA100, среднее число колоний.

Дата	Штаммы	Образцы				Заключение о мутагенности кормов +/-
		DMSO контроль	2-аминоантрацен (1 мкг/чашку, позитивный контроль)	Экстракт корма 1	Экстракт кормовой добавки 2	
24.04.17	TA100	133±40	1118±54	141±24	151±20	-
	TA98	69±7	459±39	60±15	38±6	-
11.05.17	TA100	125±36	1222±61	121±16	130±14	-
	TA98	78±8	483±24	90±18	47±10	-

Таким образом, можно заключить, что изученные образцы корма не содержат потенциальных генотоксинов и мутагенов.

Список использованной литературы

1. Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. Лух-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса//Биотехнология. – 2009. - №6. - С. 16 – 25.
2. Сазыкина М.А., Чистяков В.А., Сазыкин И.С. Генотоксичность донных отложений р. Дон (2001-2007 гг.) // Водные ресурсы. - 2012. - Т. 39. - № 1. - С. 92-98.
3. Mortelmans K., Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay // Mutat Res. - 2000. - Vol. 455(1-2). - P. 29-60.
4. Абилев С.К., Глазер В.М. Мутагенез с основами генотоксикологии. – М.: СПб.: Нестор-История, 2015. - 304 с.