

ФАРМАКОЛОГІЯ І ТОКСИКОЛОГІЯ


УДК 619:616.98:579:636.5

Токсичність, мікробіологічні показники та амінокислотний склад органічної кормової добавки Грінат

Якубчак О.М.¹ , Тишківська Н.В.², Тишківський М.Я.² 

¹ Національний університет біоресурсів і природокористування України

² Білоцерківський національний аграрний університет

 Тишківська Н.В. E-mail: natalya_tyshkivska@ukr.net



Якубчак О.М., Тишківська Н.В., Тишківський М.Я. Токсичність, мікробіологічні показники та амінокислотний склад органічної кормової добавки Грінат. Науковий вісник ветеринарної медицини, 2022. № 1. С. 110–119.

Yakubchak O., Tyshkivskaya N., Tyshkivsky M. Toxicity, microbiological parameters and amino acid composition of the organic feed additive Grinat. *Nauk. visn. vet. med.*, 2022. № 1. PP. 110–119.

Рукопис отримано: 06.04.2022 р.

Прийнято: 26.04.2022 р.

Затверджено до друку: 24.06.2022 р.

Doi: 10.33245/2310-4902-2022-173-1-110-119

Останнім часом проблема підвищення продуктивності сільськогосподарських тварин одна із найбільш важливих для ветеринарії. Оскільки селекційно "запрограмовані" на максимальну продуктивність тварини виявилися надмірно схильними до впливу антропо-техногенних і біологічних негативних чинників, наслідком цього є зниження їх продуктивності.

Проведено токсикологічні, мікробіологічні, мікологічні та хроматографічні дослідження органічної кормової добавки Грінат, до складу якої входять гумінові кислоти. Перспективним є вивчення можливості застосування препаратів, що містять гумінові речовини для підвищення продуктивності сільськогосподарських тварин та птиці, посилення загальної неспецифічної резистентності організму. Враховуючи що сировиною для виготовлення добавки є торф, токсичність, мікологічні та мікробіологічні показники є надзвичайно важливими. Токсикологічними дослідженнями (біопробами на кролях та культурі *Colpoda steinii*) доведено відсутність токсичних речовин, про що свідчить активність інфузорії колподи впродовж 10 хв та 3 год дослідження, та відсутність гіперемії і запалювальних процесів на шкірі кроля.

Кількість пліснявих грибів не перевищує допустимі межі $1,5 \times 10^2$ КУО/г (за нормою $5,0 \times 10^4$), якісними дослідженнями ідентифіковано методом мас-спектрометрії плісняві гриби *A. Alternata*, *C. cladosporioides*, які належать до сапрофітів і потрапляють до органічної кормової добавки Грінат із решток рослин за їх розкладання. Мікроскопічні гриби *Alternaria spp.* беруть участь у розкладанні та мінералізації рослинних решток, завдяки ферментному комплексу полігалактуроназа, що надає можливість прилаштуватися та існувати у різноманітних умовах. *Cladosporium spp.* зустрічається на відкритому повітрі та у приміщенні, у зіпсованих органічних рештках, продукують вторинні метаболіти, зокрема антибіотики, які є інгібіторами *B. subtilis*, *E. coli* та *C. albicans*.

Мікробіологічно методом мас-спектрометрії Maldi Tof виявлено *Bacillus megaterium*, що належить до ґрунтових бактерій та *Staphylococcus hominis*, що зустрічається як нешкідливий коменсал на шкірі людей і тварин. Хроматографічно підтверджено наявність незамінних амінокислот: лейцину (0,120 %), валіну (0,089 %), треоніну (0,064 %), фенілаланіну (0,039 %), ізолеїцину (0,024 %), гістидину (0,021 %), метіоніну (0,011 %), лізину (0,05 %), триптофану (0,007, що можуть сприяти уникненню дефіциту кормових компонентів у раціонах тварин.

Ключові слова: токсичність, *Colpoda steinii*, Грінат, амінокислоти, плісняві гриби, Maldi Tof, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus hominis*, *A. Alternata*, *C. cladosporioides*.

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень. Ефективність розвитку галузі тваринництва є запорукою стабільного розвитку економіки та продовольчої безпеки країни. Для підвищення продуктивності, життєздатності та збереження здоров'я сільськогосподарських тварин і птиці використовують безліч різновидів матеріалів і кормових добавок. Після введення у країнах ЄС заборони на використання кормових антибіотиків і кормів, що містять похідні білки тваринного походження, виробники вдалися до пошуку нових органічних кормових добавок. Увагу багатьох вчених [1–3] привернули препарати виготовлені на основі торфу, до складу яких входять гумінові кислоти. Гумінові речовини – основна органічна складова ґрунту, утворюються за розкладання рослинних і тваринних залишків під дією мікроорганізмів та абіотичних чинників середовища і слугують головним компонентом ґрунтового гумусу. В.І. Вернадський називав гумус продуктом коеволуції живого та неживого планетарної речовини.

Гумінові речовини характеризуються стимулюючою і адаптогенною дією на клітинному та субклітинному рівнях [4]. Експериментально в лабораторних та польових умовах були отримані численні підтвердження того, що вони впливають на ростові процеси рослин.

Водночас властивості гумінових речовин можна використовувати у тваринництві. Л.М. Степченко із співавт. [5] наводять низку таких прикладів. Зокрема, з метою підвищення приросту маси тварин та птиці, посилення загальної неспецифічної резистентності організму, як кормову добавку у раціонах великої рогатої худоби та птиці [6–8].

Отже, застосування кормової добавки на основі гумінових кислот у раціоні сільськогосподарських тварин, що впливає на збільшення кількості та якості біологічних продуктів з одного боку, а з іншого – активізує механізми природної резистентності організму [9], є актуальним питанням сьогодення.

Гумінові кормові добавки, які, здебільшого, виробляють з екологічно безпечного торфу, не накопичуються в організмі, а беруть участь у процесах метаболізму з утворенням кінцевих продуктів. Ці речовини не токсичні, не проявляють ембріотоксичність, не мають тератогенного впливу на тварин [10].

На сьогодні є різні погляди щодо механізму участі гумінових сполук у процесах метаболізму в організмі продуктивних тварин. Ці гіпотези пов'язані здебільшого з певними біологічними властивостями гумінових речовин, такими як здатність впливати на стан біоло-

гічних мембран та їх проникність для різних субстратів, а також безпосередньої участі їх як у реакціях обміну речовин, так і біоенергетичних процесах. Розглядається також ще один аспект дії гумінових речовин на організм тварин, який забезпечує підтримання гомеостазу через участь їх у регуляції структурних та функціональних взаємозв'язків за гормоноподібним проявом. Не зважаючи на це, механізм дії гумінових сполук на організм тварин поки що остаточно не з'ясований, що визначило напрям дослідження.

Дослідження проводили на препараті Грінат вітчизняного виробництва. Враховуючи, що органічна кормова добавка є новим препаратом на вітчизняному ринку ми намагались впевнитись, що препарат є безпечним та якісним.

Мета дослідження – визначити токсичність, мікробіологічні показники та амінокислотний склад органічної кормової добавки Грінат.

Матеріал та методи дослідження. Дослідження проводили у Експертному центрі діагностики та лабораторного супроводу "Біолайтс". Матеріалом для дослідження були 3 зразки органічної кормової добавки Грінат, відібрані з різних партій, виробничого об'єднання ТОВ "Грінат Екосістемс", розроблений українськими та австрійськими вченими, що являє собою комплекс біологічно активних речовин природного походження, виготовлений з органічної природної сировини (торф, реструктурована вода, леонардит). Це рідина темно-коричневого кольору, зі слабким специфічним запахом. Уміст низькомолекулярних органічних гумінових кислот та фульвокислот становить 44,4 і 24,2 % відповідно.

Органічна кормова добавка Грінат призначена для перорального застосування, проте можливе також місцеве застосування.

Загальну токсичність органічної кормової добавки Грінат визначали біопробами на кролях та культурі *Colpoda steinii* (колпода) згідно з ДСТУ 13496.7–97 [11] і "Настановою по застосуванню культури *Colpoda steinii* (колпода)" [12]. Кролів для досліду утримували в умовах віварію Експертного центру діагностики та лабораторного супроводу "Біолайтс", відповідно до діючих "Санітарних правил по будові, обладнанню та утриманню експериментально-біологічних клінік (віваріїв)" за стабільного температурного режиму 18–24 °С. Годували тварин повнораціонним комбікормом, за стандартною схемою. Перед початком експерименту, тварин протягом 14 діб витримували в адаптаційному періоді, під час якого проводили щоденне ретельне спостереження

їх клінічного стану. Експериментальні дослідження за вивчення загальної токсичності органічної кормової добавки Грінат проводили на трьох кролях масою тіла 2–2,5 кг. В день проведення дослідження у кролів в ділянці лопатки вистригали шкіру розміром 6х6 см. Правий бік використовували для аплікації органічної кормової добавки Грінат, лівий – для контролю. Досліджувану кормову добавку наносили відкритим способом за температури навколишнього середовища 19–23 °С. На попередньо підготовлену ділянку шкіри кроля дворазово наносили органічну кормову добавку Грінат та рівномірно розподіляли на поверхні шкіри. Площа нанесення становила 6х9 см (54 см²) в об'ємі 2,5 см³ на 1 кг маси тварини. На ділянку зліва (контроль) аналогічно наносили дистильовану воду. Дослідних тварин розміщували в індивідуальних клітках, наявність болючості в ділянці аплікації визначали за реакцією тварини на пальпацію.

Методи визначення токсичності кормів шкіряною пробою – на шкірі кроля заснований на дерматонекротичній дії ацетонового екстракту токсичних речовин мікогенного походження, а на культуру інфузорії колпиди впливали водняним екстрактом кормів.

Для приготування водяного екстракту 20 г органічної кормової добавки Грінат вносили у колбу ємністю 250 см³ і заливали 100 см³ дистильованої води. На апараті для струшування рідин зі швидкістю (120±2) об./хв колбу струшують впродовж 20 хв, після чого суміш фільтрували через паперовий складчастий фільтр.

Із 50 г органічної кормової добавки Грінат за допомогою апарату Сокслета впродовж 6 годин отримували ацетоновий екстракт, який упарювали до отримання олійного залишку. Залишок поділяли на 2 рівні частини і наносили на 1- і 2-ий день на ретельно вистрижену ділянку світлої шкіри кроля розміром 6х6 см у ділянці стегна, лопатки або боку кроля масою 2–3 кг. На ділянці залишали вільне місце для контролю. Спостереження за реакцією починали наступного дня, після повторного нанесення екстракту і продовжували протягом 3–5 діб.

Підрахунок дріжджів та пліснявих грибів проводили згідно з ДСТУ ISO 7954:2006 [13], загальне бактеріальне забруднення – ДСТУ ISO 4833:2006 [14], крім того проводили якісне дослідження мікроорганізмів за допомогою ідентифікації методом мас-спектрометрії *Maldi Tof*.

Амінокислотний склад органічної кормової добавки Грінат проводили у хіміко-аналітичному відділі Експертного центру "Біолайтс" (керівник відділу В.І. Павлінчук), згідно з

ДСТУ EN ISO 17180:2015, за методом іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії на автоматичному амінокислотному аналізаторі *Sykam S433* з постколонковою дериватизацією нінгідрином виробництва "*Sykam GmbH* (Німеччина). Принцип роботи полягає в тому, що елюент насосом перекачується через хроматографічну колонку. На виході із колонки до елюату мікронасосом додається нінгідриновий реактив, дотримуючись співвідношення з елюатом. Суміш, що утворилася, а саме елюат та нінгідриновий реактив по капілярній трубці подається у реактор, який нагрівається до температури 95–98 °С, а звідти у проточну кювету. Оптичну щільність визначають фотоелектроколориметром.

Результати дослідження реєструються самописним способом у вигляді хроматограми. Площу піків на хроматограмі підраховують і порівнюють із площею піків амінокислот відомої концентрації, визначаючи абсолютну кількість амінокислот у дослідженному зразку.

Як елюент-розчинник, що витісняє амінокислоти з хроматографічної колонки зазвичай застосовують натрій цитратний буфер. Проте, глютамін і аспарагін та амінокислоти небілкового походження не розділяються за використання цього розчинника. У зв'язку з цим, останнім часом як розчинник застосовують літій цитратні буфери.

Для підготовки зразка до аналізу застосовували метод гідролізу хлористоводневою кислотою: у пробірку із вогнетривкого скла (пірекс) вносять зразок масою 2 мг, до якого додають 0,5 см³ дистильованої води і 0,5 см³ концентрованої хлористоводневої кислоти. Гідроліз проводили на автоматичній системі розкладання проб *Milestone Ethos Easy*. По закінченню програми гідролізат переносять у мірний циліндр на 25 см³, після чого аліквоту 2 см³ доводять у мірній колбі на 10 см³ за допомогою буфера з рН 2,2 і наносять на іонообмінну колонку аналізатора амінокислот. Для розрахунку амінокислот досліджуваного зразка, попередньо аналізують стандартні зразки у яких відома концентрація кожної амінокислоти. На хроматограмі розраховують площу піка кожної амінокислоти (або висоту піка). Кількість мікромолей кожної амінокислоти (X_i) у дослідному розчині обчислюють за формулою:

$$X_i = S_i / S_0,$$

де S_i – площа піків (або висота) амінокислоти в досліджуваному зразку;

S_0 – площа піків (або висота) цієї ж амінокислоти у розчині стандартної суміші амінокислот, що відповідає 1 мкм кількості кожної амінокислоти.

Кількість у міліграмах одержують за множення кількості мікромолей амінокислоти на відповідну їй молекулярну масу. Якісний склад суміші амінокислот визначають, порівнюючи хроматограми стандартної і досліджуваної суміші амінокислот.

Результати дослідження. Для токсикологічних досліджень органічної кормової добавки Грінат застосовували флакони (не менше 2 шт.) із леофілізованою культурою інфузорій *Colpoda steinii* (колпода) та флакон із поживним середовищем. У флакони із сухою культурою колподи додавали по 2 см³ поживного середовища із термостатуванням протягом 12–24 год за температури 25±2 °С. Перед дослідженням важливо перевірити активність колподи, з цією метою культуру розглядали під мікроскопом за збільшення від 80х до 150х, у полі зору має бути не менше 5 клітин, що активно рухаються.

У флакон з активною культурою колподи вносять 1 см³ профільтрованого водного екстракту Грінат, що досліджується і перемішують. У контрольний флакон вносять 1 см³ дистильованої води. Флакони ставлять у термостат за температури 25±2 °С і витримують впродовж всього дослідження. Активність культури *Colpoda steinii* перевіряють через 10 хв від початку дослідження, враховують наявність живих та загинувших інфузорій. Якщо у пробі, що до-

сліджується загинула більшість (більше 90 %) інфузорій подальше дослідження припиняють, за наявності більшості живих інфузорій – продовжують термостатування до 3 годин з наступною мікроскопією.

У контрольному зразку інфузорії мають бути рухливими протягом усього періоду дослідження.

Жоден із трьох зразків водного екстракту органічної кормової добавки Грінат не чинив впливу на ефективність рухливості колпод впродовж 10 хв та 3 год спостереження, що свідчить про відсутність токсичних речовин.

Токсикологічні дослідження зразків органічної кормової добавки Грінат підтверджені шкірною біопробою. На шкірі кроля відмічали відсутність гіперемії та запалювальних процесів.

Отже, жоден із трьох зразків органічної кормової добавки Грінат – не містить токсичних речовин.

За результати мікологічного дослідження ріст мікроскопічних грибів було виявлено у розведенні 1:10 та 1:100, кількість пліснявих грибів коливалась в межах від 1,5 x10² до 2,4x10² КУО/г (табл. 1), що відповідає вимогам 131 наказу (5,0x10⁴ КУО/г) [15]. За якісного дослідження плісневих грибів з ідентифікацією методом мас-спектрометрії MALDI-TOF було виявлено мікроскопічні гриби: *A. alternata* та *C. cladosporioides* (рис. 1; табл. 1).

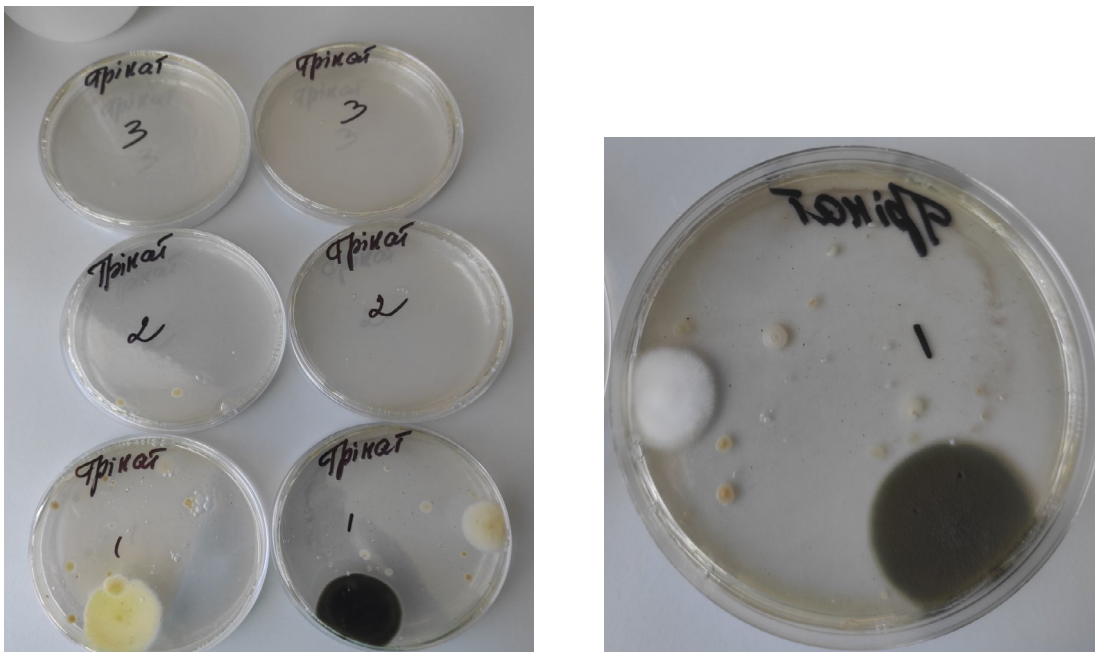


Рис. 1. Мікологічне дослідження органічної кормової добавки Грінат.

Таблиця 1 – Результати токсикологічних досліджень органічної кормової добавки Грінат

№ п/п	Показник	Результати випробувань		
		зразок 1	зразок 2	зразок 3
1	Визначення загальної токсичності біопробою на інфузорії колподи	не токсичний	не токсичний	не токсичний
2	Визначення загальної токсичності шкіряною пробою	не токсичний	не токсичний	не токсичний
3	Підрахунок дріжджів та пліснявих грибів, КУО в 1 г	1,5x10 ²	1,8x10 ²	2,4x10 ²
4	Мікологічне обстеження з ідентифікацією методом MALDI-TOF	<i>A. alternata</i> ; <i>C. cladosporioides</i>	<i>A. alternata</i>	<i>C. cladosporioides</i>
5	Мікробіологічне дослідження з ідентифікацією методом MALDI-TOF	<i>B. megaterium</i>	<i>B. megaterium</i> , <i>St. hominis</i>	<i>B. megaterium</i>

Alternaria alternata широко розповсюджена у природі, належить до сапрофітів та розвивається на будь-яких органічних субстратах.

C. cladosporioides – найчастіше зустрічається на відкритому повітрі та у приміщенні, у зіпсованих органічних рештках і вважається важливим забруднювачем харчових продуктів [18].

Отже, плісняві гриби потрапили до органічної кормової добавки Грінат із решток рослин за їх розкладання.

За мікробіологічного дослідження в усіх трьох зразках було виявлено *Bacillus megaterium* (*B. megaterium*), що являє собою грампозитивну аеробну спороутворювальну

нейтральну бактерію, яка наявна у навколишньому середовищі, її часто виділяють із меду та бджолиного пилку (рис. 2).

У одному зразку (зразок 2) виявили *Staphylococcus hominis* (*St. hominis*), що належить до коагулазонегативних стафілококів. Досить часто зустрічається як нешкідливий коменсал на шкірі людей і тварин [23].

У відібраних зразках органічної кормової добавки Грінат із незамінних амінокислот найбільшу кількість становив лейцин 0,120±0,0018 %, за коливання значень від 0,118 до 0,124 %, дещо менша кількість валіну і треоніну 0,089±0,0023 та 0,064±0,0051 % відповідно (табл. 2).

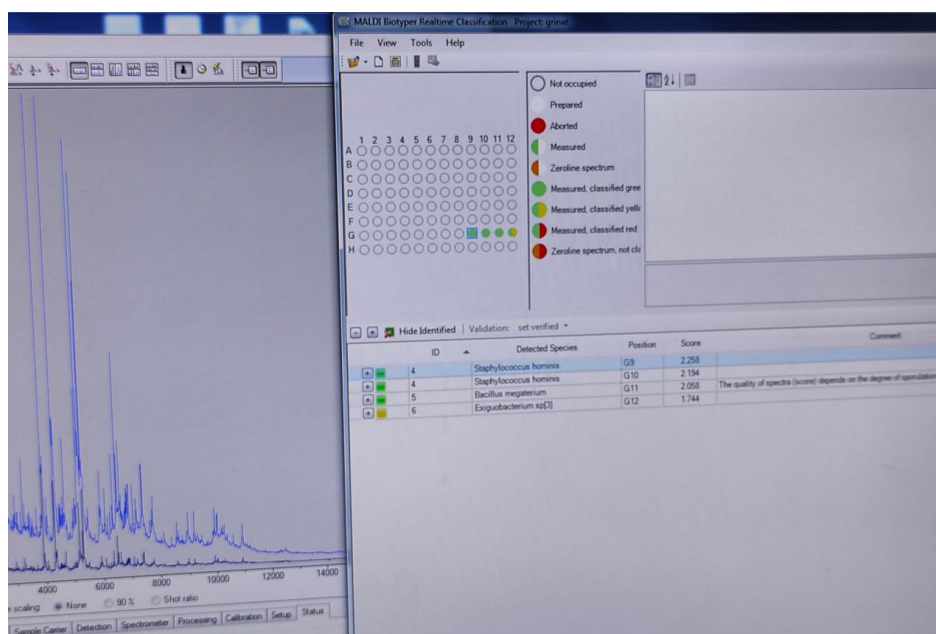


Рис. 2. Результати мікробіологічної ідентифікації мікроорганізмів методом Maldi Tof.

Таблиця 2 – Амінокислотний склад органічної кормової добавки Грінат

№ п/п	Амінокислота	Кількість амінокислот	
		M±m	Lim
1	Аспарагін	0,173±0,0043	0,167–0,182
2	Треонін	0,064±0,0051	0,054–0,072
3	Серин	0,043±0,0061	0,033–0,055
4	Глутамін	0,145±0,044	0,136–0,151
5	Пролін	0,051±0,0064	0,041–0,062
6	Гліцин	0,095±0,0023	0,094–0,098
7	Аланін	0,078±0,0032	0,075–0,084
8	Цистин	0,077±0,0021	0,074–0,082
9	Валін	0,089±0,0023	0,086–0,092
10	Метіонін	0,011±0,0014	0,009–0,014
11	Ізолейцин	0,024±0,0021	0,021–0,029
12	Лейцин	0,120±0,0018	0,118–0,124
13	Тирозин	0,025±0,0042	0,019–0,033
14	Фенілаланін	0,039±0,0061	0,031–0,051
15	Гістидин	0,021±0,004	0,017–0,029
16	Триптофан	0,007±0,0006	0,006–0,008
17	Лізін	0,050±0,0023	0,046–0,054
18	Аргінін	0,051±0,0022	0,047–0,055

Найменшу кількість становили метіонін 0,011±0,0014 % та триптофан 0,007±0,0006 %.

Із умовно-замінних амінокислот найбільшу кількість становили: аспарагін 0,173±0,0043 % та глутамін 0,145±0,044 %, гліцин – 0,095±0,0023 %, аргінін 0,051±0,0022 %, пролін 0,051±0,0064 %, серин та тирозин становили 0,043 та 0,025 % за коливання значень від 0,033 до 0,055 % та від 0,019 до 0,033 % відповідно (табл. 2).

Обговорення. Покращення продуктивності тварин одне із головних завдань лікаря ветеринарної медицини. Для вирішення цього завдання застосовують високопоживні кормові раціони, а також різні лікарські препарати: стимулятори росту, імуномодулятори, адаптогени, вітаміни, антиоксиданти та інші препарати, що мають анаболічну дію, нормалізують обмін речовин і підвищують загальну неспецифічну резистентність організму [3]. Проте, значна частина цих препаратів на сьогодні є забороненою, оскільки вони здатні кумулювати і потрапляти в організм людини з продуктами тваринництва, що є основною перешкодою для їх використання [10, 17].

Увагу вчених привернула перспективність застосування препаратів, що містять гумінові речовини для підвищення продуктивності сільськогосподарських тварин [2, 3, 6]. Гумінові речовини є високомолекулярними сполуками, що утворюються в процесі деградації рослинного лігніну в ґрунтах, торфах, вугіллі та інших природних об'єктах, складаючи невід'ємну

частину системи кругообігу органічної речовини біосфери [10]. Відомо, що цей клас сполук має виражену біологічну активність, проявляючи антиоксидантні, імуностимулюючі, адаптогенні, дезінтоксикаційні та інші властивості [6]. Однак, аналіз літературних даних показує, що основний обсяг досліджень присвячений вивченню впливу гумінових сполук на організм рослин, бактерій і стан ґрунту, а провідним напрямом практичного застосування є використання гуматів як добрива [7]. На сьогодні властивості органічних кормових добавок, виготовлених на основі торфу, потребують детального вивчення.

Вивчення органічної кормової добавки Грінат розпочали з визначення загальної токсичності. За результатами досліджень було встановлено відсутність токсичних речовин, оскільки зберігалась рухливість колпод впродовж 10 хв та 3 год спостереження, а на шкірі кроля відсутні гіперемія та запалювальні процеси.

Мікологічними дослідженнями виявили мікроскопічні гриби *Alternaria alternata* та *Cladosporium cladosporioides*, які широко розповсюджені у природі, їх відносять до сапрофітів. Плісняві гриби потрапляють у кормову добавку із залишків рослин та сприяють їх розкладанню. Резервуаром *Alternaria spp.* є рослини, що відмирають та рослинні залишки, з яких гриб потрапляє у ґрунт [16]. Разом із іншими грибами *Alternaria spp.* беруть участь у розкладанні та мінералізації рослинних решток.

Цьому сприяє комплекс ферментів, виявлених у сапрофітних альтернатив: полігалактуроназа, що забезпечує можливість прилаштуватися та існувати у досить різноманітних умовах [17].

C. cladosporioides – можуть використовувати різні субстрати для росту, такі як деревні рослини, мертві рослини, продукти харчування, ґрунт, соломка та текстиль [19, 20]. Загальний предок був ідентифікований лише для 15 видів *Cladosporium*. Багато видів *Cladosporium spp.* здатні продукувати деякі вторинні метаболіти, такі як антибіотики, які є інгібіторами *B. subtilis*, *E. coli* та *C. albicans*.

Мікробіологічно встановлено наявність *Bacillus megaterium*, що часто виділяють із навколишнього середовища та продуктів харчування. Проте здебільшого її відносять до ґрунтової бактерії, що має здатність стимулювати ріст рослин, включаючи здатність біоконтролю проти патогенів рослин [22].

Staphylococcus hominis (*St. hominis*) належить до коагулазонегативних стафілококів, часто виявляють на шкірі людей і тварин [23], більшість штамів колонізують шкіру протягом відносно короткого періоду часу на відміну від інших видів стафілококів [24]. Шляхи потрапляння *St. hominis* у Грінат прослідкувати складно, проте бактеріальне та мікологічне дослідження варто проводити у кожній партії, адже показники безпечності препарату безпосередньо пов'язані із контамінацією сировини.

Визначення амінокислотного складу органічної кормової добавки Грінат надзвичайно важливо, адже амінокислоти позитивно впливають на здоров'я тварин, а відтак підвищують якість м'ясної та молочної продукції. Застосування кормових амінокислот може бути одним із способів уникнення дефіциту кормових компонентів у раціонах тварин [25].

Незбалансованість раціонів за амінокислотним складом, очевидно, зумовлює порушення обміну речовин в організмі тварин, зниження їх резистентності та продуктивності, призводить до зменшення в туші вмісту протейнів і збільшення вмісту жиру [25]. Органічна кормова добавка Грінат у повному обсязі не забезпечить організм тварин незамінними амінокислотами, проте за споживання щодня позитивно впливатиме на ріст і розвиток тварин.

Висновки. 1. За результатами токсикологічного дослідження органічна кормова добавка Грінат визнана не токсичною, оскільки активність *Colpoda steinii* зберігалась протягом 3 год дослідження, за постановки шкірної проби на кролях гіперемія була відсутньою.

2. Мікологічними дослідженнями встановлено наявність пліснявих грибів у кілько-

сті $1,5 \times 10^2$ КУО/г (за нормою $5,0 \times 10^4$), якісні дослідження вказали наявність *A. Alternata*, *C. cladosporioides*, які належать до сапрофітів і потрапляють до органічної кормової добавки Грінат із решток рослин за їх розкладання.

3. Методом мас-спектрометрії Maldi Tof виявлено *Bacillus megaterium*, що належать до ґрунтових бактерій та *Staphylococcus hominis*, що зустрічається як нешкідливий коменсал на шкірі людей і тварин.

4. Органічна кормова добавка Грінат містить незамінні, умовно-замінні та замінні амінокислоти, що може сприяти уникненню дефіциту кормових компонентів у раціонах тварин.

Відомості про дотримання етичних норм. Експериментальні дослідження проводили із дотриманням вимог Закону України № 3447 – IV від 21.02.06 р. “Про захист тварин від жорстокого поводження” та відповідно до основних принципів “Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та наукових цілей” (Страсбург, 1986), декларації “Про гуманне ставлення до тварин” (Гельсінкі, 2000) і Національного конгресу з біоетики “Загальні етичні принципи експериментів на тваринах” (Київ, 2001).

Відомості про конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кайсин Л. Эффективность использования торфа в качестве кормовой добавки в комбикормах для кур. Вісник Сумського нац. аграрн. ун-ту. 2021. № 2 (45). С. 29–33. DOI:10.32845/bsnau.lvst.2021.2.4
2. Disetl A.R.P., Marume U., Mlambo V., Hugo A. Effects of dietary humic acid and enzymes on meat quality and fatty acid profiles 285 of broiler chickens fed canola-based diets. Asian-Australas J. Anim. Sci. 2019. No. 32. P. 711–720. DOI: 10.5713/ajas.18.0408.
3. Kocabağlı N., Alp M., Acar N., Kahraman R. The effects of dietary humate supplementation on broiler growth and carcass yield. Poult. Sci. 2002. Vol. 81. P. 27–30. DOI:10.1093/ps/81.2.227
4. Murray P.J., Wynn T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. Nat. Rev. Immunol. 2011. Vol. 11. P. 723–737. DOI:10.1038/nri3073
5. Stepchenko L., Dyomshyna O., Ushakova G. The impact of the humate nature feed additives on the antioxidative status of erythrocytes, liver, and muscle in chickens, hens, and gerbils. Biointerface Research in Applied Chemistry. 2021. 11(5). P. 13202–13213. DOI:10.33263/BRIAC115.1320213213.
6. Šamudovská A., Demeterová M. Effect of diet supplemented with natural humic compounds and sodium humate on performance and selected metabolic variables in broiler chickens. Acta Veterinaria Brno. 2010. No. 79. P. 385–393. DOI:10.2754/avb201079030385.

7. Steinberg C.E.W. Ecology of humic substances in freshwaters. Springer 2003. 332 p. DOI:10.1007/978-3-662-06815-1

8. Multiple factorial analysis of physicochemical and organoleptic properties of breast and thigh meat of broilers fed a diet supplemented with humic substances/B. Semjon et al. Poultry Science. 2020. No. 99. P. 1750–1760. DOI:10.1016/j.psj.2019.11.012.

9. Buchko O., Havryliak V. Effect of the Supplement of Humic Origin on the Free Radical Processes and Histological Changes in the Tissues of Rats Affected by Chromium (VI). Biointerface Research in Applied Chemistry. 2021. Vol. 11. No. 3. P. 10996–11008. DOI:10.33263/BRIAC113.1099611008.

10. Effect of the Addition of Humic Substances as Growth Promoter in Broiler Chickens Under Two Feeding Regimens/A. Domínguez-Negrete et al. Animals. 2019. 9 p. DOI:10.3390/ani9121101.

11. ДСТУ 3570-97 Зерно фуражне, продукти його переробки, комбікорми. Методи визначення токсичності. Чинний від 1999-01-10. Вид. офіц. Київ: УкрНДНЦ, 1999. 15 с.

12. Настанова по застосуванню культури *Colpoda steinii* (колпода) сухої для еколого-токсикологічних досліджень об'єктів зовнішнього середовища, тварин та птиці: затверджена Державним департаментом ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України від 11.03.2002 р.

13. ДСТУ ISO 7954:2006 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Загальні настанови з підрахунку дріжджів і мікроскопічних грибів. Техніка підрахунку колоній, культивованих за температури 25°C (ISO 7954:1997, IDT). Чинний від 2007-01-10. Вид. офіц. Київ: УкрНДНЦ, 2007. 10 с.

14. ДСТУ ISO 4833:2006 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод підрахунку мікроорганізмів. Техніка підрахунку колоній за температури 30 °C (ISO 4833:2003, IDT). Чинний від 2007-01-10. Вид. офіц. Київ: УкрНДНЦ, 2007. 11 с.

15. Наказ № 131 Про затвердження Переліку максимально допустимих рівнів небажаних речовин у кормах та кормовій сировині для тварин. Зареєстр. в Міністерстві юстиції України 5 квітня 2021 р. за №503/20816

16. Екологія грибів: монографія/ Г.Л. Атоняк та ін. Львів: ЛНУ Івана Франка, 2013. 628 с. ISBN 978-966-613-752-7

17. Данилова А.А., Салимова Д.Р., Берестецкий А.О. Грибы рода *Alternaria* как продуценты биологически активных соединений и биогрибцидов (обзор). Прикладная биохимия и микробиология. Т. 56. № 3. С. 223–241. DOI:10.31857/S0555109920030022.

18. Hickman D.T, Rasmussen A., Ritz K. Riview: Allelochemicals as multi-kingdom plant defence compounds: towards an integrated approach. Pest management Science. 2021 (77). P. 1121–1131. DOI:10.1002/ps.6076

19. Problems and prospects in the study of plant allelochemicals: a brief introduction, in Chemical Ecology of Plants: Allelopathy in Aquatic and Terrestrial Eco-

systems/ ed. by A.U. Mallik and S. Inderjit. Birkhäuser Verlag, Basel, 2002. P. 1–5. DOI:10.1007/978-3-0348-8109-8_1

20. Effect of indoor mold concentrations on daily symptom severity of children with asthma and/or rhinitis monosensitized to molds/A. Inal et al. J. Asthma. 2007. Vol. 44. 7. P. 543–546. DOI:10.1080/02770900701496130

21. Gale E.F. Te Bacterial Amino Acid Decarboxylases. John Wiley & Sons. 2006. (1). P. 309–387. DOI:10.1002/9780470122518.

22. Goswami G., Panda D., Samanta R., Boro R.Ch. *Bacillus megaterium* adapts to acid stress condition through a network of genes: Insight from a genome-wide transcriptome analysis. Scientific RePOrtS, 2018. (8). 16105 p. DOI:10.1038/s41598-018-34221-0

23. Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal Intensive Care Unit/F. Chaves et al. J. Clin. Microbiol. 2005. (43). P. 4877–4879. DOI:10.1128/JCM.43.9.4877-4879.2005.

24. Roy P., Ahmed N.H., Biswal I., Grover R.K. Multidrug-resistant *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* causing septicemia in patients with malignancy. Indian J. Pathol. Microbiol. 2014. Vol. 57. P. 275–277. DOI:10.4103/0377-4929.134708.

25. Gannon M.C., Nuttall F.Q. Aminoacid ingestion and glucose metabolism. IUBMB life. 2010. Vol. 62(9). P. 660–668. DOI:10.1002/iub.375.

REFERENCES

1. Kaisyn, L. (2021). Effektivnost yspolzovaniya torfa v kachestve kormovoi dobavky v kombykormakh dlia kur [Effectiveness of using peat as a feed additive in compound feed for chickens]. Visnyk Sumskoho nats. ahrarn. un-tu [Bulletin of the Sumy National Agrarian University], no. 2 (45), pp. 29–33. DOI:10.32845/bsnau.lvst.2021.2.4

2. Disetlthe, A.R.P., Marume, U., Mlambo, V., Hugo, A. (2019). Effects of dietary humic acid and enzymes on meat quality and fatty acid profiles 285 of broiler chickens fed canola-based diets. Asian-Australas J. Anim. Sci. no. 32, pp. 711–720. DOI:10.5713/ajas.18.0408.

3. Kocabağlı, N., Alp, M., Acar, N., Kahraman, R. (2002). The effects of dietary humate supplementation on broiler growth and carcass yield. Poult. Sci. Vol. 81, pp. 27–230. DOI:10.1093/ps/81.2.227

4. Murray, P.J., Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. Nat. Rev. Immunol. Vol. 11, pp. 723–737. DOI:10.1038/nri3073

5. Stepchenko, L., Dyomshyna, O., Ushakova, G. (2021). The impact of the humate nature feed additives on the antioxidative status of erythrocytes, liver, and muscle in chickens, hens, and gerbils. Biointerface Research in Applied Chemistry. 11(5), pp. 13202–13213. DOI:10.33263/BRIAC115.1320213213.

6. Šamudovská, A., Demeterová, M. (2010). Effect of diet supplemented with natural humic compounds and sodium humate on performance and se-

lected metabolic variables in broiler chickens. *Acta Veterinaria Brno*. no. 79, pp. 385–393. DOI:10.2754/avb201079030385.

7. Steinberg, C.E.W. (2003). *Ecology of humic substances in freshwaters*. Springer, 332 p. DOI:10.1007/978-3-662-06815-1

8. Semjon, B., Marcinčáková, D., Koréneková, B. (2020). Multiple factorial analysis of physicochemical and organoleptic properties of breast and thigh meat of broilers fed a diet supplemented with humic substances. *Poultry Science*. no. 99, pp. 1750–1760. DOI:10.1016/j.psj.2019.11.012.

9. Buchko, O., Havryliak, V. (2021). Effect of the Supplement of Humic Origin on the Free Radical Processes and Histological Changes in the Tissues of Rats Affected by Chromium (VI). *Biointerface Research in Applied Chemistry*. Vol. 11, no. 3, pp. 10996–11008. DOI:10.33263/BRIAC113.1099611008.

10. Domínguez-Negrete, A., Gómez-Rosales, S., Angeles, M.D. (2019). Effect of the Addition of Humic Substances as Growth Promoter in Broiler Chickens Under Two Feeding Regimens. *Animals*. 9 p. DOI:10.3390/ani9121101.

11. DSTU 3570-97 (1999-01-10) Zerno furazhne, produkty yoho pererobky, kombikormy. *Metody vyznachennia toksychnosti*. Chynnyj vid 1999-01-10. Vyd. ofits. [DSTU 3570-97 Fodder grain, products of its processing, compound feed. Methods of determining toxicity. Effective from 1999-01-10. View. officer]. Kyiv: UkrNDNTs, 15 p.

12. Nastanova po zastosuvanniu kultury Solpoda steinii (kolpoda) sukhoi dlia ekolohto-toksykologichnykh doslidzhen obektiv zovnishnoho sere dovyschcha, tvaryn ta ptytsi. *Zatverdzhena Derzhavnym departamentom veterynarnoi medytsyny Ministerstva ahraanoi polityky Ukrainy vid 11.03.2002 r* [Guidelines for the use of dry Solpoda steinii culture for ecological and toxicological studies of environmental objects, animals and poultry: approved by the State Department of Veterinary Medicine of the Ministry of Agrarian Policy of Ukraine dated March 11, 2002].

13. DSTU ISO 7954:2006 Mikrobiologija harchovyh produktiv i kormiv dlja tvaryn. *Zagal'ni nastanovy z pidrahunku drizhdzhiv i mikroskopichnyh grybiv*. Tehnika pidrahuvannja kolonij, kul'tyvovanyh za temperatury 25°C (ISO 7954:1997, IDT). Chynnyj vid 2007-01-10. Vyd. ofic. [DSTU ISO 7954:2006 Microbiology of food products and animal feed. General guidelines for counting yeast and microscopic fungi. Technique for counting colonies cultivated at a temperature of 25°C (ISO 7954:1997, IDT). Effective from 2007-01-10. View. officer]. Kyiv: UkrNDNTs, 10 p.

14. DSTU ISO 4833:2006 Mikrobiologija harchovyh produktiv i kormiv dlja tvaryn. *Goryzontal'nyj metod pidrahunku mikroorganizmiv*. Tehnika pidrahunku kolonij za temperatury 30 °S (ISO 4833:2003, IDT). Chynnyj vid 2007-01-10. Vyd. ofic. [DSTU ISO 4833:2006 Microbiology of food products and animal feed. Horizontal method of counting microorganisms. Colony counting technique at a temperature of 30 °C (ISO 4833:2003, IDT). Effective from 2007-01-10. View. officer]. Kyiv: UkrNDNTs, 11 p.

15. Nakaz № 131 (5 kvitnia 2021 r) Pro zatverdzhennia Pereliku maksimalno dopustymykh rivniv nebazhanykh rehovyn u kormakh ta kormovii syrovyni dlja tvaryn. *Zarejestr. v Ministerstvi justycii' Ukrainy 5 kvitnja 2021 r. za №503/20816* [Order No. 131 On Approval of the List of Maximum Permissible Levels of Unwanted Substances in Fodder and Fodder Raw Materials for Animals. Register at the Ministry of Justice of Ukraine on April 5, 2021 under No. 503/20816].

16. Atoniak, H.L., Kalynets-Mamchur, Z.I., Dudka, I.O., Babych, N.O., Panas, N.Ye. (2013). *Ekolohiia hrybiv: monohrafiia* [Ecology of fungi: monograph]. Lviv: LNU Ivan Franko, 628 p. ISBN 978-966-613-752-7

17. Danylova, A.A., Salyмова, D.R. Berestetskyi, A.O. (2020). Griby roda *Alternaria* kak produkty biologicheskii aktivnykh soedinenij i biogirbicidov (obzor) [Alternaria fungi as producers of biologically active compounds and bioherbicides (review)]. *Prikladnaja biohimija i mikrobiologija* [Applied biochemistry and microbiology]. Vol. 56, no. 3, pp. 223–241. DOI:10.31 857/S0555109920030022.

18. Hickman, D.T., Rasmussen, A., Ritz, K. (2021). *Riviev: Allelochemicals as multi-kingdom plant defence compounds: towards an integrated approach*. *Pest management Science*. (77), pp. 1121–1131. DOI:10.1002/ps.6076

19. Mallik, A.U., Inderjit, S. (2002). Problems and prospects in the study of plant allelochemicals: a brief introduction. *Chemical Ecology of Plants: Allelopathy in Aquatic and Terrestrial Ecosystems*. pp. 1–5. DOI:10.1007/978-3-0348-8109-8_1

20. Inal, A., Karakoc, G.B., Altintas, D.U. (2007). Effect of indoor mold concentrations on daily symptom severity of children with asthma and/or rhinitis sensitized to molds. *J Asthma*. Vol. 44 (7), pp. 543–546. DOI:10.1080/02770900701496130

21. Gale, E.F. (2006). *Te Bacterial Amino Acid Decarboxylases*. John Wiley & Sons. (1), pp. 309–387. DOI:10.1002/9780470122518.

22. Goswami, G., Panda, D., Samanta, R., Boro, R. Ch. (2018). *Bacillus megaterium* adapts to acid stress condition through a network of genes: Insight from a genome-wide transcriptome analysis. *Scientific RePortS*, (8), 16105 p. DOI:10.1038/s41598-018-34221-0

23. Chaves, F., García-Alvarez, M., Sanz, F., Alba, C., Otero, J.R. (2005). Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal Intensive Care Unit. *J. Clin Microbiol.* (43), pp. 4877–4879. DOI:10.1128/JCM.43.9.4877-4879.2005.

24. Roy, P., Ahmed, N.H., Biswal, I., Grover, R.K. (2014). Multidrug-resistant *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* causing septicemia in patients with malignancy. *Indian J. Pathol. Microbiol.* Vol. (57), pp. 275–277. DOI:10.4103/0377-4929.134708.

25. Gannon, M.C., Nuttall, F.Q. (2010). Amino acid ingestion and glucose metabolism. *IUBMB life*. Vol. 62(9), pp. 660–668. DOI:10.1002/iub.375.

Toxicity, microbiological parameters and amino acid composition of the organic feed additive Grinat
Yakubchak O., Tyshkivskaya N., Tyshkivsky M.

Recently, the problem of increasing the productivity of farm animals is one of the most important for veterinary medicine. Since the animals "programmed" for maximum productivity by selection turned out to be excessively exposed to anthropogenic and biological negative factors, the result of this is a decrease in their productivity.

Conducted toxicological, microbiological, mycological and chromatographic studies of the organic feed additive "Greenat", which includes humic acids. It is promising to study the possibility of using preparations containing humic substances to increase the productivity of farm animals and poultry, to enhance the general nonspecific resistance of the body. Given that peat is the raw material for the manufacture of the additive, toxicity, mycological and microbiological indicators are extremely important. Toxicological studies (bioassays on rabbits and *Colpoda steinii* culture) proved the absence of toxic substances, as evidenced by the activity of the colpoda infusoria for 10 minutes and 3 hours of the study, and the absence of hyperemia and inflammation on the skin of the rabbit.

The number of mold fungi does not exceed the allowable limits of 1.5×10^2 CFU/g (according to the norm 5.0×10^4), qualitative studies revealed and identi-

fied by mass spectrometry the mold fungi *A. alternata*; *C. cladosporioides*, which belong to saprophytes and get into the organic feed additive "Grinat" from the remains of plants during their decomposition. Microscopic fungi *Alternaria spp.* participate in the decomposition and mineralization of plant residues due to the polygalacturonase enzyme complex, which allows them to attach themselves and exist in various conditions. *Cladosporium spp.* found outdoors and indoors, in degraded organic debris, produce secondary metabolites such as antibiotics that are inhibitors of *B. subtilis*, *E. coli*, and *C. albicans*.

Microbiologically, Maldi Tof mass spectrometry detected *Bacillus megaterium*, which belongs to soil bacteria, and *Staphylococcus hominis*, found as a harmless commensal on the skin of humans and animals. Chromatographically confirmed the presence of essential amino acids: leucine (0.120%), valine (0.089%), threonine (0.064%), phenylalanine (0.039%), isoleucine (0.024%), histidine (0.021), methionine (0.011%), lysine (0.05%), tryptophan (0.007%). Accordingly, conditionally replaceable and non-essential amino acids, which can help to avoid a shortage of feed components in animal diets.

Key words: Greenate, *Colpoda steinii*, general toxicity, amino acids, molds, Maldi Tof, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus hominis*, *A. alternata*, *C. cladosporioides*.



Copyright: Якубчак О.М., Тишківська Н.В., Тишківський М.Я. ©
 This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ORCID iD:

Якубчак О.М.

<https://orcid.org/0000-0002-9390-6578>

Тишківський М.Я.

<https://orcid.org/0000-0003-0826-5276>

