

На правах рукописи

**ГИЧЕНКОВ Сергей Геннадьевич**

**Использование природного сырья для отечественных инсекто-акарицидов на примере креолина**

16.00.04- Ветеринарная фармакология с токсикологией

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание учёной степени  
кандидата ветеринарных наук**



Воронеж 2003 г.

Работа выполнена в ГУ Волгоградском научно-исследовательском технологическом институте мясомолочного скотоводства и переработки продукции животноводства РАСХН

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор  
Тимофеев Борис Александрович

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор  
Аргунов Муаед Нурдинович;  
кандидат ветеринарных наук  
Василенко Виталий Васильевич

Ведущая организация – Московская академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина.

Защита диссертации состоится "11" декабря 2003 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 006.004.01 во Всероссийском научно-исследовательском институте патологии, фармакологии и терапии по адресу: 394087, г. Воронеж, ул. Ломоносова, 114-б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВНИВИПФиТ.

Автореферат разослан "03" ноября \_\_\_\_\_ 2003 года

Учёный секретарь  
Диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Т.И. Ермакова

2003-А  
17722

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Мир паразитических насекомых и клещей очень разнообразен. Ныне известно почти 900 тыс. видов. Истинное же их число на планете около 1,5 млн. Однако, из них паразитических членистоногих всего лишь 1%. Все они отличаются между собой образом жизни, развитием, вредоносностью и т.д. Это вызывает необходимость проведения практических мероприятий по борьбе с ними, которые строятся дифференцировано, с учётом своеобразия биоэкологии паразитов в условиях внешней среды (Т.Г. Аббасов и др. 1999).

Как известно, паразитические членистоногие наносят большой экономический ущерб народному хозяйству. В частности, кровососущие двукрылые насекомые, паразитируя на животных, снижают удои на 30-40%, прирост массы – на 15-20%.

Предлагаемый зарубежными производителями широкий ассортимент пестицидов и созданных на их основе разнообразных форм инсекто-акарицидных препаратов обусловил возникновение существенных затруднений в реализации на российском рынке отечественной конкурентноспособной продукции, уступающей зарубежным аналогам, прежде всего, по качеству дизайна и упаковке.

В условиях постоянно нарастающей конкуренции на фоне переживаемых отечественной промышленностью известных трудностей периода реформирования организационно-правовых форм собственности, инфляции, неплатежей, острой недостаточности оборотных средств произошел спад объёмов производства отечественной продукции, а в ряде случаев и фактическое прекращение производства инсекто-акарицидных средств. Установленные импортерами высокие цены на продукцию повлекло существенное снижение объёмов их закупок, необходимых для удовлетворения потребностей практической ветеринарии, сделали такие препараты малодоступными россиянам, вынуждая отказываться от их приобретения для использования не только на фермерском или подсобном хозяйстве, но даже в быту при уходе за мелкими домашними животными – собаками, кошками и др.

Вместе с тем, необходимо отметить, что в последние годы наука и практика широко стали использовать в комплексных инсекто-акарицидных препаратах креолин (гексалин, креопир, креохин – Б.А. Тимофеев и др., 1992, 1994). Необходимым сырьём для получения креолина служит каменноугольная смола, из которой помимо вышеназванного креолина, получают лизол, поверхностно-активные вещества, фенол и т.д. (С.Н. Лазорин, Б.М. Пац, 1966).

Однако, до последнего времени токсические свойства креолина (в полном объёме), его остаточные количества в органах и тканях животных были изучены явно недостаточно.

**Цель и задачи исследований.** В связи с вышеизложенным перед нами были поставлены следующие задачи:

- изучить токсические свойства креолина (острую и хроническую токсичность, влияние на функцию печени);
- изучить мутагенные, эмбриотоксические и тератогенные свойства креолина;
- провести ветеринарно-санитарную экспертизу мяса овец, обработанных креолином;
- разработать методику определения остаточных количеств креолина в органах и тканях животных после их обработки указанным препаратом;
- изучить его остаточные количества в органах и тканях крупного рогатого скота и овец;
- провести сравнительное изучение инсекто-акарицидной активности композиции креолина и циперметрина (креолина X), циперметрина (хинмикса) и одного креолина.

### **Научная новизна.**

1. Впервые разработана методика определения остаточных количеств креолина в органах и тканях сельскохозяйственных животных после их обработки указанным препаратом с помощью газо-жидкостной хроматографии, а также методика определения концентрации нафталина в креолине методом высокоэффективной жидкосной концентрации.

2. Изучена безопасность креолина для животных, определены его токсические и физико-химические свойства. В соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 препарат относится к III классу опасности.

Установлено отсутствие у креолина алергизирующих, эмбриотоксических и тератогенных свойств, мутагенной активности и отсутствие влияния препарата на функциональное состояние печени и гомеостаз овец.

3. Установлено, что у крупного рогатого скота и овец обработанных 2%-ной водной эмульсией креолина, наличие креолина в органах и тканях через 24, 48 и 96 часов не обнаружено. Мясо подопытных овец после купки в 3%-ной эмульсии креолина, отвечает требованиям ветеринарно-санитарной экспертизы.

4. При сравнительном изучении инсекто-акарицидных свойств креолина -X, хинмикса и одного креолина на изолированных клещах *Psoroptes cuniculi* установлено: СК<sub>50</sub> для креолина - X составляет 0,0161; СК<sub>16</sub> - 0,0089; СК<sub>84</sub> - 0,0258; для хинмикса (циперметрин) - СК<sub>50</sub> - 0,041; СК<sub>16</sub> - 0,03; СК<sub>84</sub> - 0,056; для одного креолина СК<sub>50</sub> - 0,09; СК<sub>16</sub> - 0,05; СК<sub>84</sub> - 0,1.

5. Концентрация креолина - X (по ДВ) от 0,01 до 0,1% вызывала гибель изолированных клещей *Sarcoptes suis* через 2-3 минуты; хинмикс и один креолин в той же концентрации вызывали гибель этих паразитов соответственно через 8-10 и 25-30 минут.

### **Практическая значимость работы.**

Обоснована возможность использования креолина для создания новых инсекто-акарицидных препаратов пролонгированного действия.

Показана удовлетворительная переносимость креолина животными, низкая его токсичность.

Разработаны и переданы в Департамент государственного санитарно-эпидемиологического надзора Министерства здравоохранения РФ.

1. Методические указания по измерению концентрации нафталина в органах и тканях животных методом газожидкостной хроматографии (МУК 4.1.-03) после их обработки креолином;

2. Методические указания по измерению концентрации нафталина в бесфенольном креолине методом высокоэффективной жидкостной хроматографии;

3. Получено из Государственной санитарно-эпидемиологической службы РФ Санитарно-эпидемиологическое заключение № 77.99.18.939.А.000150.09.03 от 08.09.2003 г. на креолин - X.

4. Переданы материалы в Государственную санитарно-эпидемиологическую службу РФ на креолин бесфенольный для получения заключения.

**Реализация результатов исследований.** Результаты исследований могут быть использованы в ветеринарной практике при создании комплексных инсекто-акарицидов на основе креолина (креолин -X).

**Апробации работы.** Материалы диссертации доложены на межлабораторном совещании научных сотрудников Волгоградского НИТИ мясомолочного скотоводства и переработки продукции животноводства; на региональной научно-производственной конференции "Экологические аспекты производства и переработки сельскохозяйственного сырья для создания продуктов питания XXI века" (Волгоград, 1999); международной научно-практической конференции "Проблемы и перспективы совершенствования производства пищевых продуктов с высокими потребительскими свойствами на основе улучшения качества животноводческого сырья" (Волгоград, 2002); во Всероссийском выставочном центре (ВВЦ, Москва) 17.06.2002 г.; семинарах-совещаниях руководителей и зооветспециалистов хозяйств районных и областного Комитетов по сельскому хозяйству и продовольствию Администрации Волгоградской области (2000-2003 гг.); на расширенном заседании научных сотрудников и специалистов ГУ ВНИТИ ММС и ППЖ РАСХН (Волгоград, 2003); на Всероссийской научно-практической конференции "Системы технологии продовольственного сырья и пищевых продуктов" ГУ ВНИТИ ММС и ППЖ РАСХН (Волгоград, 2003 г.).

**Публикации результатов исследований.** Основные положения диссертации изложены в 5-х печатных работах, 2 статьи находятся в печати.

**Объём и структура работы.** Диссертация изложена на 130 страницах и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов. Работа включает 27 таблиц, спи-

сок литературы включает 113 источников, в том числе 31 зарубежных авторов.

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

- токсические свойства креолина;
- остаточные количества креолина в органах и тканях животных после обработки указанным препаратом.

## **2. УСЛОВИЯ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Экспериментальные исследования проводили в Волгоградском научно-исследовательском технологическом институте мясомолочного скотоводства и переработки продукции животноводства, в хозяйствах Волгоградской области, ОАО "Завод ветеринарные препараты" г. Гусь-Хрустальный.

Исследования инсекто-акарицидной активности креолина -Х, хинмикса (ДВ-циперметрин) и креолина проводили как в лабораторных, так и производственных условиях. В камеральных опытах исследования выполняли на модели чесоточных клещей кроликов - *P. cuniculi* и свиней - *Sarcoptes suis*. Изучение проводили согласно "Методическим указаниям по первичному отбору новых акарицидов и сравнительному изучению их активности против саркоптоидных клещей", утверждённым ГУВ МСХ СССР в 1982 г.

### Физико-химические свойства креолина.

При изучении физико-химических свойств креолина определяли по общепринятым методикам следующие параметры: внешний вид, запах, цвет, эмульгируемость, массовую долю влаги нафталина и инфракрасные спектры.

Изучение острой и хронической токсичности препаратов проводили на белых мышах, крысах, морских свинках, кроликах с массой тела соответственно 18-20 грамм, 190-250 грамм, 250-300 грамм, 1,5-2 кг, а также овцах (35-40 кг). Препарат лабораторным животным вводили внутривенно, на кожу, а овец купали. Для опыта использовали клинически здоровых животных, находившихся в одинаковых условиях содержания и кормления. Результаты опытов обработаны статистически по методу Литчфилда и Уилкоксона (М.Л. Беленький, 1963; А.Н. Кудрин, Р.Т. Пономарёва, 1967).

Аллергизирующие свойства креолина изучали с помощью методики гистаминного шока (М.Л. Гершанович, 1954), влияние на антитоксическую функцию печени по методу Д.Р. Розина (1964), оценку местного действия на слизистые оболочки глаз путём инстиляции на конъюнктиву кроликов. В качестве тестов, характеризующих гомеостаз овец, использовали гематологические показатели (уровень Hb, количество эритроцитов и лейкоцитов), активность щелочной фосфатазы по Баданскому, холинэстеразы по Херцвельду и Штумфу (И. Тодоров, 1968), концентрации общего белка в сыворотке крови – рефрактометрическим способом.

Ветеринарно-санитарную экспертизу мясopодуkтов от овец проводили согласно ГОСТ 7269-79 и 23392-78. Для этих целей 6 овец разделили на 2 группы: опытную (3 головы) и контрольную (3 головы). Опытных животных

купали в 3%-ной водной эмульсии креолина. Экспозиция – 1 мин. Через сутки овцы 2-х групп были убиты. Для анализа отбирали пробы мяса, лимфатических узлов, печени, почек, селезёнки, сердца, лёгких. Проводили органолептические, бактериологические, физико-химические и гистологические исследования. При физико-химическом анализе учитывали величину pH, аминоаммиачный азот, реакции на пероксидазу, с медным купоросом, содержание летучих жирных кислот (ЛЖК), коэффициент кислотности - окисляемости (ККО).

#### Изучение эмбриотоксического и тератогенного действия креолина.

В основу изучения эмбриотоксического и тератогенного действия креолина были положены "Методические указания по изучению эмбриотоксического действия фармакологических веществ и влияние их на репродуктивную функцию", одобренные Фармакологическим комитетом МЗ СССР 10 января 1986 г.

Опыты проводили на белых беспородных крысах-самках массой 180-200 грамм и самцах 230-250 грамм, которые являются общепринятыми для такого рода исследований. Для опытов использовали крыс только с нормальным эстральным циклом, который является показателем нормального функционирования репродуктивной системы.

Для получения датированной беременности самок на стадии проэструса и раннего эструса подсаживали к самцам в соотношении 3:1 и утром следующего дня исследовали у них влагалищный мазок. День обнаружения спермиев в мазке считали первым днём беременности.

Результаты опытов учитывали на 20-й день беременности. Животных убивали декапитацией, вскрывали брюшную полость, извлекали матку и яичники. В яичниках под стереоскопическим микроскопом подсчитывали количество жёлтых тел, в матке – число живых и мёртвых плодов, а также число мест имплантаций и резорбции и т.д.

Показателем тератогенности служило число плодов с уродствами (в процентах по отношению к общему числу живых плодов). При этом учитывали уродства, обнаруживаемые как при макроскопическом, так и при исследовании внутренних органов и костной системы. Плоды взвешивали и определяли их кранио- каудальный размер, определяли пол и т.д.

После внешнего осмотра плоды в помёте от каждой самки делили на две равные группы для исследования на наличие аномалий внутренних органов по методу Вильсона (1965) в модификации отдела эмбриологии НИИЭМ АМН СССР (А.П. Дыбан и др., 1970) и костной системы после её окрашивания по методу Даусона (1926).

#### Изучение мутагенного действия креолина.

Для проведения исследований был выбран метод анателофазного анализа. Исследования проводили в соответствии с "Методическими рекомендациями по определению мутагенной активности ветеринарных препаратов", утверждёнными отделением ветеринарии ВАСХНИЛ (Москва, 1983 г). Исследование мутагенных свойств креолина проведены на 2-х группах белых беспородных крысах (первоначальная масса тела 120-140 грамм) подвергав-

шихся воздействию препарата в условиях субхронического эксперимента в течение 30 дней. 6 и 3%-ной креолиновой эмульсией купали обе группы животных. Ежедневно: экспозиция – 2 минуты.

Статистическую значимость различий устанавливали по величине "t" и критерия Стьюдента. Различия считались существенными (достоверными) при  $P < 0,05$ , при  $0,5 < P < 0,1$  и несущественными при  $P > 0,05$ .

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАФТАЛИНА В КРЕОЛИНЕ И ОСТАТКОВ КРЕОЛИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

В связи с тем, что в креолине наибольшая концентрация приходится на нафталин, поэтому дальнейшее исследования были посвящены по его определению в самом креолине, органах и тканях крупного рогатого скота и овец после их обработки креолином.

Измерение концентрации нафталина в бесфенольном креолине методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Метод основан на использовании принципа ВЭЖХ для определения нафталина в бесфенольном креолине на колонке ZOZBAX ODS в системе растворителей: ацетонитрил: 0,2% раствор ортофосфорной кислоты, детектирование нафталина спектрофотометрическим детектором при длине волны 270 нм.

Для количественного анализа использовали метод внешнего стандарта. В качестве внешнего стандарта для градуировки брали стандартный образец нафталина с известным содержанием основного вещества.

Средства измерения, посуда и реактивы.

Хроматограф жидкостной фирмы Gilson или аналогичный по техническим характеристикам, УФ- детектор с переменной длиной волны фирмы Gilson или аналогичный по техническим характеристикам, петлевой дозатор с объёмом петли 200 мм<sup>3</sup> или аналогичный и другие приборы и реактивы, необходимые для выполнения газохроматографических работ.

Для расчёта содержания нафталина определяли характеристики погрешности измерений: диапазон содержания указанного элемента, сходимости, воспроизводимости, границы относительной погрешности.

Измерение концентрации нафталина в органах и тканях животных методом газожидкостной хроматографии.

При проведении этих опытов пришлось отказаться от жидкостной хроматографии из-за: во-первых сравнительно низкой чувствительности метода (ВЭЖХ – 0,6 ppm; в ГЖХ – чувствительность на порядок выше) и во-вторых из-за гораздо более сложной, но необходимой и регулярной очистки (промывки) колонки. В конечном счете, анализ проводили методом ГЖХ с пламенно-ионизационным детектором.

Метод основан на извлечении нафталина путём экстракции этиловым эфиром из биологических объектов животных (селезёнка, печень, почки, сердце, лёгкое, мышечная и жировая ткани и т.п.), очистки экстрактов сублимацией (возгонкой) нафталина из экстрактов с улавливанием нафталина

адсорбентами с силикагелем, последующим вымыванием нафталина этиловым эфиром из адсорбентов и измерении сигнала нафталина методом газожидкостной хроматографии.

#### Метрологические характеристики методики.

Приведённые оптимальные аппаратурные параметры и условия выполнения измерений относятся к газожидкостному хроматографу TRACOR-360. Минимально детектируемое количество (чувствительность определения) – 1 нг. Линейный диапазон детектирования 0,85 – 4,35 нг. Предел обнаружения массовых долей нафталина в биологических объектах составляет величину 0,03 мг/кг.

При выполнении указанных исследований определяли характеристики погрешностей измерений: диапазон содержания изучаемого элемента, сходимость, воспроизводимость и границы относительной погрешности.

#### Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы.

Газожидкостный хроматограф TRACOR-360 или любой другой с пламенно-ионизационным детектором; колонка хроматографическая стеклянная, длиной 2 м, внутренним диаметром 3,5 мм; самописец типа LINEAR или аналогичный; весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с пределом взвешивания 200 г ГОСТ 24104 и другие приборы и реактивы, необходимые для проведения газожидкостной хроматографии.

#### Условия выполнения измерений

При выполнении измерений необходимо соблюдать следующие условия: температура термостата колонки – °С – 135, температура испарителя – °С – 160, температура детектора – °С – 260, расход азота – см<sup>3</sup>/мин – 60, расход водорода – см<sup>3</sup>/мин – 30, расход воздуха – см<sup>3</sup>/мин – 300, скорость диаграммной ленты – см/ч – 15, объём вводимой пробы – мкл 2-5, чувствительность электрометра мА –  $5 \times 10^{-12}$ .

Приготовление растворов. Раствор нафталина с массовой концентрацией 0,50 мг/50 см<sup>3</sup>. В мерную колбу ёмкостью 50 см<sup>3</sup> взвешивали на микро весах 0,5 мг нафталина (точность взвешивания ± 0,002 мг), добавляли 10 см<sup>3</sup> ацетона, растворяли навеску полностью и доводили до метки ацетоном, перемешивали.

Изучение остаточных количеств нафталина в органах и тканях крупного рогатого скота и овец после обработки их креолином. Для этих целей 6 овец в возрасте 2-х лет были икупаны в 2%-ной водной эмульсии креолина и убиты 2 головы через 24, 2 – через 48, 2 – через 96 часов; 6 телят в возрасте 6 месяцев были обработаны методом опрыскивания 2%-ной водной эмульсией креолина (объём 3 литра). Двое животных были убиты через 24, 2 – через 48, 2 – через 96 часов.

Для анализа содержания нафталина у животных брали пробы печени, почек, селезёнки, лёгких, сердца и мышц.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1. Физико-химические свойства креолина.

Креолин бесфенольный каменноугольный представляет собой смесь 55-60% масла каменноугольного (бесфенольного или фенолсодержащего) 20-25% канифольного масла, едкой щелочи, ихтиола и воды.

По внешнему виду – это однородная маслообразная жидкость с запахом каменноугольного масла от темно-коричневого до темно-бурого цвета. С водой образует стойкую эмульсию молочно-белого цвета.

В технические условия на креолин введены следующие показатели: внешний вид, цвет, запах, содержание влаги, нафталина, эмульгируемость, проверка токсичности на овцах. В последнее время выпускают креолин с минимальным количеством фенола (не более 2-3%), в связи с чем он получил название бесфенольный креолин.

Для стандартизации креолина следует использовать концентрацию нафталина, что определяется с помощью жидкостной хроматографии. Концентрация нафталина составляет около 11%.

Характеристика 5%-ной водной эмульсии креолина приведена в таблице 1.

Таблица 1.

Характеристика 5%-ной водной эмульсии креолина.

Наименование показателей	Растворитель	
	Дистиллированная вода	Водопроводная вода
Внешний вид	Однородная маслообразная жидкость, прозрачная в тонком слое	Однородная маслообразная жидкость, прозрачная в тонком слое
Запах	Каменноугольного масла	Каменноугольного масла
Цвет	От темно-коричневого до бурого	От темно-коричневого до чернo-бурого
Эмульгируемость	5%-ная водная эмульсия не расслаивается при стоянии	5%-ная водная эмульсия не расслаивается при стоянии
Массовая доля влаги, %	16	16
Массовая доля нафталина, %	11	11
Токсичность на овцах	Безвреден	Безвреден

Креолин обладает хорошей эмульгирующей способностью, как в мягкой, так и в жесткой воде; 5%-ная водная эмульсия препарата отличается устойчивостью, стабильностью, однородностью и не расслаивается в течение длительного времени (3-4 суток).

Инфракрасные спектры креолин характеризуются отсутствием сильной полосы поглощения при  $1120\text{ см}^{-1}$  и наличием широкой сильной полосы при  $3430\text{ см}^{-1}$ , обусловленной присутствием связанной воды (валентные колебания С-Н- связи).

### 3.2. Острая токсичность креолина.

ЛД-50 креолина при внутрижелудочном ведении белым мышам составляет  $480 (406,8 \div 566,4)$  мг/кг, для белых крыс –  $740 (578,1 \div 947,2)$  мг/кг. ЛД-50 при накожном нанесении для белых крыс составляет  $15520 (13857 \div 17382)$  мг/кг. Кожно-оральный коэффициент равен 20,97. ЛД-50 для овец при купке составляет  $9500 (9050,9 \div 11210,0)$  мг/кг или выраженная в процентной концентрации  $9,50 (8,05 \div 11,21)\%$ ; МПД – 5167 мг/кг.

Хроническое отравление животных сопровождалось жировой дистрофией, застоем крови в органах брюшной полости и лёгких.

### 3.3. Аллергизирующие свойства креолина

Для проведения опытов в указанном направлении были отобраны 21 морская свинка с массой тела 250-300 г. В 1-й группе 7-ми свинками вводили физиологический раствор (контроль). 2-й группе орально вводили 1 мл/гол водной суспензии креолина (2%-ная концентрация), 3-й вводили креолин в дозе 2 мл/гол. Через 2 часа свинкам подкожно вводили гистамин (0,5%-ный водный раствор в дозе 0,5 мл/кг) и наблюдали время наступления шока (2 часа). Реакция на введение гистамина через 2 часа была одинаковой как у опытных, так и контрольных свинок, их гибель наступала через одинаковое время. Таким образом, креолин не обладает аллергизирующими свойствами.

### 3.4. Влияние креолина на слизистые оболочки кроликов.

5-ти кроликам на слизистую оболочку левого глаза была нанесена 2%-ная водная суспензия креолина (по 5 капель), в правый – нанесли 0,9%-ный физиологический раствор NaCl. При дальнейшем наблюдении было установлено, что рабочие эмульсии креолина не оказывали неблагоприятного воздействия на слизистые оболочки глаз.

### 3.5. Влияние креолина на антитоксическую функцию печени.

Для проведения опытов в указанном направлении была использована гексеналовая проба. Для этой цели белым мышам 1-й группы алиментарным путём было введено 0,5 мл 2%-ной водной эмульсии креолина; 2-ой группе – 0,2 мл; 3-й – вода в дозе 0,5 мл. Гексенал вводили в виде 2%-ного раствора внутривентриально в дозе 40 мг/кг массы тела через 4 часа после дачи креолина. В результате было отмечено, что продолжительность сна у мышей 1-ой группы составляет 3-15 минут (при 3-х не уснувших), во 2-й - 14-23 минуты;

у животных 3-й группы – 21-32 минуты. Указанные материалы дают основание полагать, что креолин не угнетает антитоксическую функцию печени.

### **3.6. Изучение влияния креолина на гематологические показатели овец.**

С целью изучения влияния креолина на организм овец последних купали в 3,0%-ной водной эмульсии указанного препарата. Исследование гематологических показателей проводили через 30 минут, 3 и 48 часов после обработки овец. Контролем служили исследования, проведённые у тех же животных до применения препарата.

В результате анализа полученных данных можно сделать вывод о том, что количество гемоглобина, эритроцитов и лейкоцитов у животных, обработанных креолином, колеблется в пределах физиологической нормы (статистически достоверных различий не установлено).

### **3.7. Влияние креолина на некоторые биохимические показатели сыворотки крови овец.**

Опыты с указанным препаратом проводили путём купки 3 подопытных овец в 3,0%-ной водной эмульсии.

Анализ полученных данных свидетельствовал о наличии определённых колебаний активности щелочной фосфатазы с концентрацией общего белка, однако эти изменения статистически недостоверны. Активность холинэстеразы у подопытных животных через 3 часа после обработки достоверно снижалась по сравнению с контролем на 33,4% и 38,4%. На 2-е сутки она вновь достигала значения, близкого к исходному.

### **3.8. Ветеринарно-санитарная экспертиза мяса и других продуктов убоя овец, обработанных эмульсией креолина.**

При органолептическом исследовании мясopодуkтов овец, обработанных 3,0%-ной эмульсией креолина, на поверхности туш установлена корочка подсыхания бледно-розового цвета, слегка влажные, плотные и упругие мышцы красного цвета, со свойственным баранине запахом, жир белого цвета без посторонних запахов. Бульон, полученный при варке мяса, прозрачный, ароматный, посторонние запахи отсутствуют.

Микроскопия показала почти абсолютную стерильность продуктов убоя овец опытных и контрольных групп. Исключением была констатация роста кокковой микрофлоры (2-3 колонии) на среде Эндо в печени 1-й группы животных и почках II-й группы (контрольной) – *E.coli*. При исследовании характера роста колоний на мясopептонном агаре (МПА) в лимфатических узлах овец II-й группы обнаруживали *E.coli*. Проведённые исследования не выявили токсикогенных свойств выросших микроорганизмов.

Физико-химические показатели мяса овец, подвергнутых купке в креолине, и контрольных имели количественные и качественные значения, соответствующие нормам доброкачественного мяса здоровых животных. Концентрация водородных ионов в исследуемых пробах находилась в пределах 5,9-6,2, что характеризует созревшее мясо, с нормально протекающими биохимическими процессами. Содержание аминокислотного азота (ААА) как в контрольной, так и в опытных группах, находилось в пределах  $1,19 \pm 0,01$ ;  $1,17 \pm 0,02$  мг КОН, что также соответствует требованиям доброкачественного мяса.

Бензидиновая реакция во всех исследуемых пробах была положительной, что согласовывается с показаниями pH и указывает на нормальное течение процессов созревания в мясе.

Реакция с медным купоросом в бульоне, заключающаяся в осаждении солями тяжёлых металлов продуктов полураспада белка, во всех исследованных пробах была отрицательной (фильтрат бульона после добавления раствора сернокислой меди оставался прозрачным), что также является характерным признаком доброкачественного мяса, с нормально протекающими биохимическими процессами. Содержание летучих жирных кислот (ЛЖК) во всех пробах колебалось в пределах, соответствующих доброкачественному мясу –  $2,35 \pm 0,01$ . Коэффициент кислотности - окисляемости (ККО) указывает на одинаковое накопление кислых продуктов в мясе контрольной и опытных групп животных.

Гистологическое исследование показало, что однократная обработка овец креолином не вызывает патологических изменений в структуре мышц и внутренних органов овец.

### 3.9. Изучение эмбриотоксических и тератогенных свойств креолина.

При обработке (купке) белых крыс с 1 по 8-ой (1 группа) и с 8 по 15-й (2 группа) дни беременности в 3,0%-ной водной эмульсии креолина с экспозицией 2 минуты, гибели белых крыс не наблюдали.

Анализ данных показывает, что при купочном применении креолина, по сравнению с контролем, не оказывает эмбриотоксического действия. Так, предимплантационная гибель зародышей у животных 1-й опытной группы составляла  $12,67 \pm 2,87\%$  против  $22,58 \pm 3,42\%$  в контрольной (при  $p < 0,05$  разница достоверна) и  $14,74 \pm 3,45\%$  во 2-ой опытной группе – периоде органогенеза.

Постимплантационная смертность эмбрионов крыс в опытных группах была значительно ниже контрольной группы. Масса живых плодов в опытных группах была меньше, чем в контрольной группе. В опытных и контрольной группах состояние плодных оболочек и плацент было нормальным.

В опытах по изучению тератогенного действия креолина при внешнем осмотре у извлечённых из матки плодов, значительных видимых аномалий развития (уродств) не отмечено. Исключение составляют  $9,23 \pm 3,04\%$  гематом и  $8,46 \pm 2,82\%$  кровоизлияний против, соответственно,  $5,00 \pm 1,80\%$  и

5,83±1,24% в контрольной 9,03±3,85 и 15,30±1,53% во 2-й опытной группе. Процентное соотношение кровоизлияний у плодов 2-й опытной группы было достоверно выше, чем в контрольной ( $P<0,05$ ).

Однако при изучении состояния внутренних органов плодов установлены лишь единичные случаи аномалий развития, как в опытных, так и в контрольной группах (гидроцефалия, гидронефроз).

Кроме этого, у эмбрионов от животных, обработанных креолином, не установлено дефектов скелета. Это свидетельствует о том, что данный препарат не вызывает нарушение процессов оссификации.

Представленный материал свидетельствует о том, что при купочном применении креолин эмбриотоксическими и тератогенными свойствами не обладает.

### 3.10. Изучение мутагенных свойств креолина.

Митотический индекс клеток костного мозга бедра белых крыс подопытных групп соответствовал средним величинам физиологической нормы, характерным для белых крыс и не отличался от показателей у животных в контрольной группе. В 3%-ной концентрации креолин не влияет на уровень хромосомных aberrаций клеток костного мозга на стадии анателофазы. В 2-х кратной концентрации (6%-ная водная эмульсия) креолин вызывает незначительное, статистически достоверное по сравнению с контролем увеличение числа хромосомных aberrаций. Хромосомные aberrации были представлены хромосомными и хроматидными мостами, слипаниями и фрагментами хромосом.

Таким образом, креолин при купочной обработке белых крыс в 3% и 6%-ной водной эмульсии не обладает мутагенным действием.

### 3.11. Разработка методики определения нафталина в бесфенольном креолине.

Для этой цели готовили градуировочный раствор, который вводили в хроматограф дважды. Площади пика нафталина для каждого градуировочного раствора не должны отличаться больше, чем на 1%.

Значение градуировочного коэффициента рассчитывали по формуле:

$$K = \frac{S * 100}{H * Pr}, \quad \text{где}$$

K – градуировочный коэффициент,

S – площадь пика внешнего стандарта (нафталина), условные единицы,

H – навеска внешнего стандарта (нафталина), мг,

Pr – массовая доля основного вещества во внешнем стандарте (нафталине),%.

Значения  $K$ , рассчитанные для каждого градуировочного раствора, не должны отличаться более, чем на 1%. В противном случае следует приготовить еще один градуировочный раствор. В расчётах используют среднее арифметическое значение коэффициента  $(K_1 - K_2) \leq 0,01$ .

#### Выполнение измерений.

Условия проведения анализа.

Элюент: смесь ацетонтрила и 0,2% водного раствора ортофосфорной кислоты в соотношении 60:40. Скорость потока элюента, см/мин – 0,6; длина волны УФ – детектора, нм – 270; объём вводимой пробы, мм<sup>3</sup> – 20; температура колонки, °С – комнатная.

Для приготовления рабочих растворов бесфенольного креолина пробы взвешивали на аналитических весах в количестве 80-100 мг (взвешивание приводили с точностью 0,02 мг). Навеску помещали в мерную колбу, ёмкостью 50 см<sup>3</sup> добавляли 30 см<sup>3</sup> метанола, тщательно перемешивали. Доводили объём раствора до метки метанолом. Готовили два таких раствора. Каждый раствор ввели в хроматограф дважды. Площади пика ( $S$ ) определяемого компонента (нафталина) для каждого раствора не должны отличаться между собой более, чем на 1%. За результат измерения принимали среднее арифметическое значение  $S = (S_1 + S_2)/2$ ;  $(S_1 - S_2) < 0,01$ .

В противном случае следует приготовить еще один рабочий раствор.

Время выхода пика нафталина составляла 13,0 минут (ориентировочное значение).

#### Вычисление результата анализа.

Массовую долю определяемого компонента (нафталина в процентах) рассчитывали по формуле:

$$M = \frac{S_i \cdot 100}{K \cdot n_i}, \text{ где}$$

$M$  – массовая доля определяемого компонента, %

$S_i$  – площадь пика определяемого компонента, условные единицы,

$K$  – градуировочный коэффициент,

$n_i$  – масса пробы анализируемого образца, взятая для анализа, мг.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение из двух параллельных определений  $m_1$  и  $m_2$ . При этом следует учитывать абсолютную погрешность измерений массовой доли нафталина, которую определяли умножением полученной массовой доли нафталина на относительную погрешность.

В результате проведённых исследований содержание нафталина в креолине составляла 11%.

### 3.12. Разработка методики определения остаточных количеств креолина (по нафталину) в биологических объектах.

Подготовка к выполнению измерений. Хроматографическую колонку промывали, сушили и заполняли адсорбентом.

Готовили раствор нафталина с массовой концентрацией 0,50 мг/50 см<sup>3</sup>.

Подготовка проб к анализу и проведение испытаний. Образец биологических проб (печень, почки, селезёнка, лёгкое, сердце, мышечная ткань и т.п.) измельчали на мясорубке или микроизмельчителе ткани РТ-2, после измельчения пробу тщательно перемешивали, разравнивали и шпателем отбирали из разных мест навеску пробы массой 10-13 грамм (точность взвешивания 0,02 г). Навеску помещали в коническую колбу с притёртой пробкой ёмкостью 250 см<sup>3</sup>. Добавляли 20-25 см<sup>3</sup> этилового эфира и проводили экстракцию нафталина путём перемешивания содержимого колбы на магнитной мешалке в течение 1 часа. Эфирный экстракт сливали декантацией в коническую колбу с притёртой пробкой ёмкостью 100 см<sup>3</sup>, и в которую предварительно помещали 25-55 грамм безводного сульфата натрия. Экстракцию повторяли ещё дважды, добавляя к анализируемой пробе по 10-13 см<sup>3</sup> этилового эфира, перемешивая на магнитной мешалке содержимое колбы по 30 минут каждую экстракцию. Экстракты соединяли и концентрировали до объёма 10-12 см<sup>3</sup>, удаляя этиловый эфир с помощью водоструйного или масляного насоса при комнатной температуре с подсоединенными 3-мя адсорбционными ловушками с силикагелем SEP-ПАК фирмы Waters Associates. Затем помещали ёмкость в водяную баню, нагретую до 65<sup>0</sup>С, и подключали вакуумный насос. Осторожно отгоняли остатки этилового эфира в течение 7-10 мин., при этом нафталин сублимировали и адсорбировали на силикагельных поглотителях.

После охлаждения всей системы поглотители отсоединяли колбы и промывали каждый поглотитель с помощью шприца (объёмом 500 мкл) – 1-1,5 см<sup>3</sup> этилового эфира для извлечения нафталина. Экстракт повторно отгоняли на водоструйном или масляном насосе до объёма 1,0-1,5 см<sup>3</sup> при комнатной температуре и фиксировали объём этого экстракта (V 2).

Из пробирки отбирали необходимый объём (V 1) и вводили его в хроматограф. Объём вводимый в хроматограф пробы составлял 2-5 мкл в зависимости от содержания нафталина. Ввод каждой пробы повторяли дважды. При наличии нафталина в анализируемой пробе определяли с помощью линейки высоту сигнала нафталина в параллельных вводах (X1 и X2). За результат измерения принимали среднее арифметическое значение:  $X = (X1+X2)/2$ .

Расхождение между измеренными высотами сигналов не должны отличаться более чем на 5%, т.е.  $(X1-X2)/X < 0,05$ . В противном случае вводи пробы повторяют.

Вычисление результата анализа. Массовую долю нафталина в пробах биологических объектов при его наличии рассчитывали по формуле:

$$m = \frac{A \cdot V_2}{K \cdot n \cdot V_1}, \text{ где}$$

$m$  – массовая концентрация нафталина в анализируемом растворе, после приведения всех размерностей в соответствие выраженная в мг/кг,

$A$  – количество нафталина в пробе, найденное по калибровочному графику, мг,

$K$  – степень извлечения нафталина из биологической пробы, определённая экспериментальным путём и равная 0,75.

$n$  – масса навески, г,

$V_1$  – объём вводимой в хроматограф пробы, мкл,

$V_2$  – объём экстракции, см<sup>3</sup>.

За результат анализа принимали среднее арифметическое значение двух параллельных определений  $m_1$  и  $m_2$ .

$$m = (m_1 + m_2) / 2$$

При определении окончательного результата содержания нафталина в биологических объектах учитывали абсолютную погрешность, которую рассчитывали умножением относительной погрешности на полученные данные нафталина.

### 3.13. Определение остаточных количеств креолина (по нафталину) в органах и тканях сельскохозяйственных животных.

Обработка взятия пробы. При взятии пробы биологических объектов оптимальной оказалась масса навески не меньше 10 грамм (проба должна быть представительной) и не больше 13 грамм (проба должна быть удобной для последующих операций).

В качестве измельчителя пробы испробовали мясорубку отечественную или микроизмельчитель ткани марки РТ-2. Проведённые опыты показали в обоих случаях практически одинаковый коэффициент извлечения нафталина. В дальнейшем использовали мясорубку как наиболее простую в обращении.

Обработка экстракции нафталина из пробы. Для извлечения нафталина из биологических объектов была выбрана экстракция как наиболее простая и эффективная операция. В качестве растворителя для этих целей использовали гексан, ацетон и этиловый эфир. От гексана отказались по причине наименьшей из указанных растворителей полноты экстракции. Из оставшихся двух выбрали этиловый эфир как наиболее летучий. Для определения полноты экстрагирования использовали УЗ- ванну, перемешивание на механической или магнитной мешалках. Экстракция с помощью УЗ – ванны показала низкий коэффициент извлечения нафталина. Из 2-х мешалок остановились на магнитной, так как при использовании механической мешалки процесс экстракции шёл медленнее.

Было подобрано оптимальное время экстракции: первая экстракция – 1 час, две повторные – по 30 минут каждая. Определяли и объём растворителя

при экстракции. Оптимальным объёмом, обеспечивающим с одной стороны наивысший процент экстракции и с другой стороны – сокращение времени анализа оказались 20-25 см<sup>3</sup> для первой экстракции и по 10-13 см<sup>3</sup> для 2-х последующих.

В ходе эксперимента был определён и коэффициент экстракции, он составил величину 0,75. Потери при сублимации нафталина и отгонки растворителя незначительные и укладывались в ошибку опыта.

Точность анализа остаточных количеств пестицидов требовали проведения процедуры очистки экстракта от мешающих веществ.

В нашем случае было два варианта: обработка экстракта концентрированной серной кислотой с последующей отмывкой кислоты и возгонка нафталина из экстракта под слабым вакуумом с улавливанием нафталина с помощью поглотителей. Более быстрая и успешная процедура с возгонкой нафталина определила выбор второго варианта.

В качестве поглотителей - адсорбентов использовали удобные и простые в эксплуатации адсорбционные трубки фирмы Waters Associates, заполненные силикагелем SEP-PAK @ размером 2,5 см x 1 см.

#### Подбор наполнителя для колонок и других условий при ГЖХ анализе.

При проведении эксперимента испытывали наполнители: 3% OV-1 на хроматоне N-SUPER (размер частиц 0,16-0,20 мм), 5% OV-17 на хроматоне N-SUPER (размер частиц 0,125-0,16 мм), 5% SE-30 на хроматоне AW-DMCS, 1% SF-96 и 1% XE-60 на хромосорбе W-HP (размер частиц 80-100 меш), 5% XE-60 на хроматоне N-AW-DNCS (размер частиц 0,125-0,160 мм).

Наилучшее разделение нафталина и сопутствующих примесей получено на колонке, заполненной 1% SF-96 и 1% XE-60 на хромосорбе W-HP (размер частиц 80-100 меш), но из-за ограниченной доступности этого импортного наполнения от него пришлось отказаться. Окончательный анализ проводили на колонке с носителем 5% XE-60 на хроматоне N-AW-DNCS (размер частиц 0,125-0,160 мм). Подобран оптимальный температурный режим выполнения анализа. Условия приведены в методических указаниях.

#### Построение градуировочного графика из растворов нафталина

Для определения остаточных количеств нафталина в биологических объектах использовали градуировочный график, где на оси ординат откладывали концентрацию нафталина в нг, на оси абсцисс - высоту сигнала в мм. Градуировочный график строили, используя раствор нафталина в ацетоне. Стабильность градуировочной характеристики необходимо контролировать через каждые 20 анализируемых проб.

Анализ биологических объектов (печень, почки, селезёнка, лёгкое, сердце, мышечная ткань) животных.

Исследования проведены на животных: 6-ти телятах, 6-7 месячного возраста, симментильской породы и 6-и овцах в возрасте 2-3 лет, которых опрыскивали или купали 2%-ной водной эмульсией креолина и убивали через 24, 48 и 96 часов. В результате проведённых опытов наличие креолина в органах и тканях указанных животных не установлено.

Для подтверждения полученных выводов была проанализирована искусственная смесь, составленная из экстракта мышечной ткани овцы с добавкой в неё нафталина в количестве 0,85 мг (1,7 мкл раствора нафталина в ацетоне с концентрацией 0,5 мг/см<sup>3</sup>). На полученной хроматограмме заметен пик нафталина. На хроматограммах экстрактов органов животных обработанных креолином, пик нафталина отсутствует.

### 3.14. Опыты по сравнительному изучению инсекто-акарицидных свойств креолина-X, хинмикса и одного креолина.

При сравнительном изучении креолина –X (композиции креолина и циперметрина), хинмикса и одного креолина на изолированных клещах *Psoroptes.cuniculi* установлено: СК-50 для креолина – X составляет 0,0161; СК – 16 – 0,0089; СК-84 – 0,0258, для циперметрина (хинмикса) – СК-50 – 0,041; СК-16 – 0,03; СК-84 – 0,056; для одного креолина СК-50 – 0,09; СК-16 – 0,05; СК-84 – 0,1.

При испытании на телятах поражённых сифункулятозом, применение креолина – X путём опрыскивания в концентрации 0,005% в объёме 3 л на животное привело к гибели вшей через 3 часа; хинмикса ( в разведении 1:200) через 24 часа; креолина (3%-ная водная эмульсия) – через 48 часов.

## ВЫВОДЫ

1. В результате изучения физико-химических свойств креолина установлено следующее: препарат обладает чётко выраженной эмульгирующей способностью. Содержание нафталина 11%, влаги – 16%, не токсичен для овец в рекомендуемых дозах.

2. ЛД-50 креолина при внутрижелудочном введении белым мышам составляет 480 (406,8÷366,4) мг/кг, для белых крыс – 740 (578,1÷947,2) мг/кг. ЛД-50 при кожном нанесении для крыс – 15520 (13857÷17382) мг/кг. Кожно-оральный коэффициент равен 20,97. ЛД-50 для овец при их купке составляет 9500 (9050,9÷11210,0) мг/кг или выраженная в процентной концентрации 9,50 (8,05÷11,21)%; МПД 5167 мг/кг. Согласно ГОСТ 12.1.007-76 препарат относится к III классу опасности.

3. Креолин не обладает алергизирующим, гепатотоксическим действием и не раздражает слизистые оболочки глаз.

4. Креолин не обладает тератогенным, эмбриотоксическим и мутагенным действием.

5. Гематологические и биохимические показатели (количество гемоглобина, эритроцитов и лейкоцитов, общего белка, активность щелочной фосфатазы) у овец, искупанных 3%-ной эмульсией креолина, колебались нерезким образом и были статистически недостоверными. Активность холинэстеразы у подопытных животных через 30 минут и 3 часа после обработки достоверно уменьшалось по сравнению с контролем соответственно на 33,4 и 38,4%. На 2-е сутки она вновь достигла значения близкого к исходному.

6. Ветеринарно-санитарная экспертиза мяса и других продуктов убой овец, обработанных 3%-ной водной эмульсией креолина (органолептические показатели), бактериологические исследования баранины, физико-химические данные мяса (рН, содержание пероксидазы, реакция с медным купоросом, уровень летучих жирных кислот, аминок-аммиачный азот, коэффициент кислотности - окисляемости) являются аналогичными показателям контрольных здоровых животных.

7. Гистологическое исследование показало, что обработка овец креолином не сопровождается развитием патологическим изменением в структуре внутренних органов и тканей овец.

8. Разработана методика определения остаточных количеств креолина (по нафталину) в органах и тканях сельскохозяйственных животных с помощью газожидкостной хроматографии. Предел обнаружения массовых долей нафталина (ДВ креолина) составляет 0,03 мг/кг.

9. В органах и тканях крупного рогатого скота и овец, обработанных 2%-ной водной эмульсией креолина, убитых через 24, 48 и 96 часов после опрыскивания или купки наличие остатков креолина не установлено.

10. Установлена более высокая инсекто-акарицидная активность композиции креолина с циперметрином (креолин-Х) по сравнению с циперметрином (хинмиксом) и с одним креолином. Опыты были проведены на изолированных клещах *P. cuniculi*, *S. suis* и на телятах, поражённых сифункулятозом.

11. Концентрация креолина –Х (по ДВ) от 0,01% вызывала гибель изолированных клещей *Sarcoptes suis* через 2-3 минуты; хинмикс и креолин в той же концентрации вызывали гибель этих паразитов соответственно через 8-10 и 25-30 минут.

12. Безопасность применения креолина – Х подтверждена Государственной санитарно-эпидемиологической службой РФ (Санитарно-эпидемиологическое заключение № 77.99.18.939.А000150.09.03 от 08.09.2003 г. на креолин – Х).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Практически и теоретически показано удовлетворительная переносимость креолина сельскохозяйственными животными, отсутствие его остаточных количеств в органах и тканях после обработки указанным препаратом, а также обоснована возможность использования креолина для создания инсекто-акарицидных препаратов для усиления и пролонгации их действия.

### Список опубликованных работ.

1. Гиченков С.Г. Ветеринарно-санитарная экспертиза мяса и других продуктов овец, обработанных эмульсиями креолина // "Системные технологии продовольственного сырья и пищевых продуктов" /С.Г. Гичен-

- ков, Б.А. Тимофеев, И.Ф. Горлов.//Всероссийская научно-практическая конференция. Волгоград. 2003.-С.97-98.
2. Тимофеев Б.А. Креолин против псороптоза овец / Б.А Тимофеев, С.Г. Гиченков // Газета "Ветеринарный консультант" – 2003. № 11-12.-С. 20
  3. Горлов И.Ф. Новое в изучении токсичных свойств бесфенольного креолина / И.Ф. Горлов, Б.А. Тимофеев, С.Г. Гиченков, Н.В. Филиппов // Методическое пособие. Волгоград 2002.-С.16.
  4. Головкин Г.В. Измерения концентрации нафталина в органах и тканях животных методом газожидкостной хроматографии / Г.В. Головкин. Т.А. Егорова, Б.А. Тимофеев, И.Ф. Горлов, С.Г. Гиченков // Методическое указание МУК 4.1 – 03. М. 2003. –С.13.
  5. Головкин Г.В. Измерение концентрации нафталина в бесфенольном креолине методом высокоэффективной жидкостной хроматографии /Г.В. Головкин, Т.А. Егорова, Б.А. Тимофеев, И.Ф. Горлов, С.Г. Гиченков // Методические указания МУК 4.1 – 03. М. 2003. –С.11.
  6. Тимофеев Б.А. Идентификация остатков креолина в органах и тканях животных после обработки их указанным препаратом / Б.А. Тимофеев, И.Ф.Горлов, С.Г. Гиченков// в печати, ж. Доклады РАСХН.
  7. Тимофеев Б.А. Использование природного сырья для отечественных инсекто-акарицидов на примере креолина /Б.А. Тимофеев, И.Ф. Горлов, С.Г. Гиченков//в печати, ж. Вестник РАСХН.

Гиченков Сергей Геннадьевич

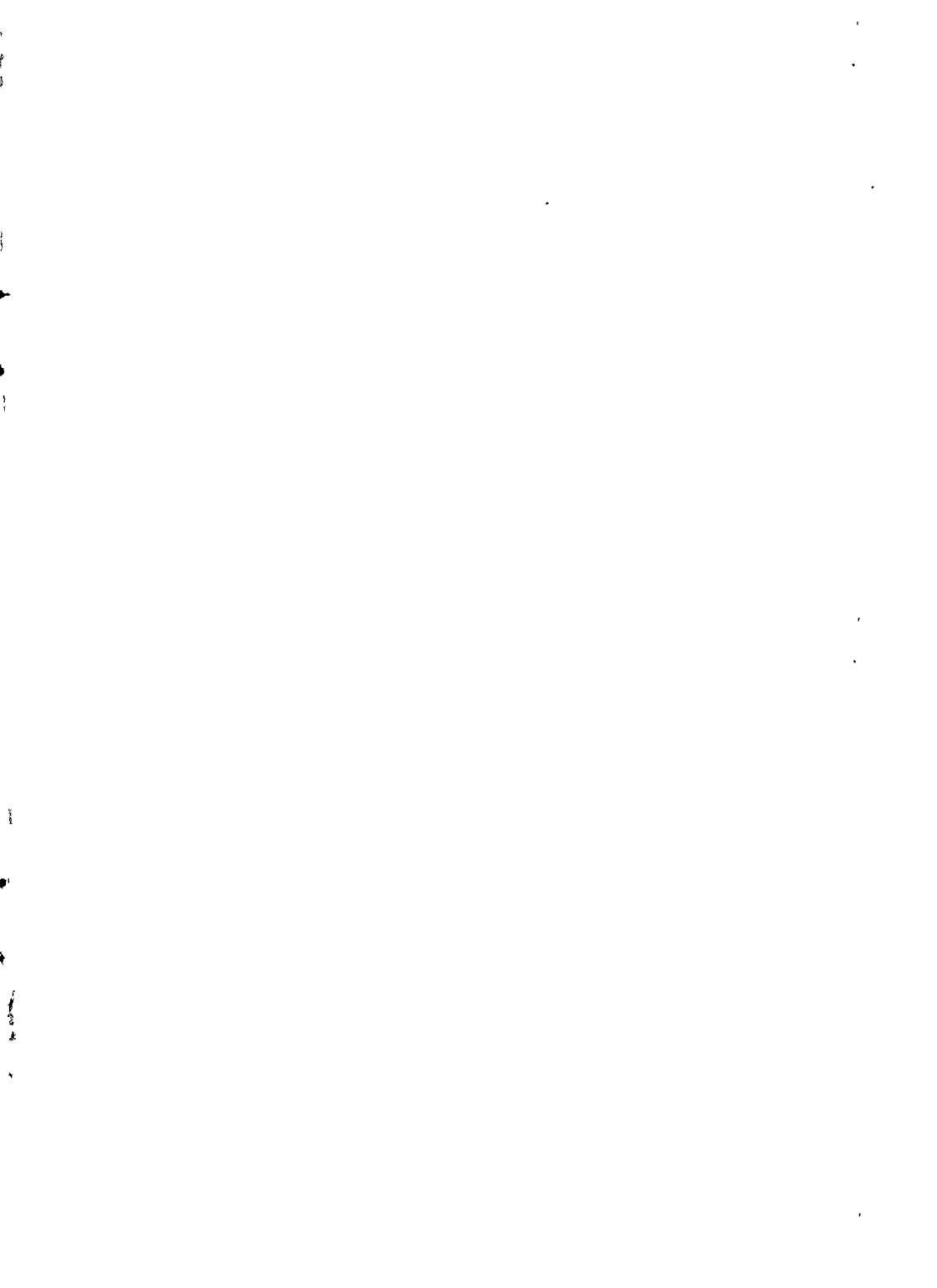
Использование природного сырья для отечественных  
инсекто-акарицидов на примере креолина

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата ветеринарных наук

Подписано к печати 17 октября 2003 г.  
Формат 60/84 1/16. Печать офсетная. Бумага офсетная.  
Усл. печ. л. – 1,0. Тираж – 100 экз. Заказ № 107

Типография ВГСХА, 400002, г. Волгоград, ул. Институтская, 8.



2003-A  
17722

#17722