

УДК 599.32:57.081.15  
doi: 10.17223/19988591/39/8

О.В. Толкачёв, О.Р. Гизуллина, Г.В. Оленев

*Институт экологии растений и животных УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия*

## **Улучшенная процедура визуального обнаружения тетрациклиновой метки при массовом мечении грызунов**

На основе анализа обширного краниального материала показано, что существующие методы визуальной диагностики тетрациклиновой метки у грызунов недостаточно надежны. Для повышения вероятности выявления меченых животных характерную флуоресценцию под ультрафиолетом необходимо искать в анилифах как верхнего резца, так и нижней челюсти. Улучшенная методика дает прирост эффективности от 37 до 55%. Обнаружены различия в проявлении тетрациклиновой метки у полевок по сравнению с мышами. Установлено, что со временем образцы от любых вываренных и очищенных черепов становятся значительно светлее в ультрафиолете, что осложняет диагностику. Интенсивность флуоресценции метки в резцах также постепенно снижается. Определен критический срок хранения образцов – три года, после которого выявление метки затрудняется. Обнаружено, что обработка пероксидом водорода, которую часто применяют при очистке черепов грызунов, ухудшает видимость тетрациклиновой метки.

**Ключевые слова:** *Apodemus agrarius*; *Microtus agrestis*; *Microtus arvalis*; *Microtus oeconomus*; *Myodes glareolus*; *Myodes rutilus*; *Sicista betulina*; *Sylviaemus uralensis*.

### **Введение**

Методы массового самомечения животных, появившись несколько десятилетий назад, применялись главным образом для решения практических задач – оценки полноты потребления приманки с вакцинами или ядами [1–3] или разработки способов борьбы с вредителями [4]. Лишь в единичных случаях этот подход использовали в теоретических исследованиях [5, 6]. Возникновение и широкое признание концепции метапопуляций привело к значительному росту интереса исследователей к изучению миграционной активности животных, поскольку именно этот процесс связывает отдельные локальные популяции в структуры более высокого порядка [7]. Использование простых и дешевых способов массового мечения позволяет проводить эксперименты в масштабах целых ландшафтов [8–11], что часто совершенно необходимо в исследованиях процессов расселения или степени изоляции группировок особей. В связи с этим стали появляться работы, направленные на совершенствование существующих методик [12–15].

Применение тетрациклина в качестве биомаркера можно отнести к числу наиболее распространенных методов массового мечения. Животное, съевшее приманку, содержащую один из антибиотиков тетрациклинового ряда, получает метку в виде желтой флуоресценции в костях и зубах, наблюдаемую под действием ультрафиолета [16]. Явление вызвано тем, что тетрациклин и его дериваты образуют хелатные комплексы с ионами кальция в момент его депонирования в костных структурах [17]. Поэтому флуоресценция обнаруживается на тех участках, где происходил рост в тот период, когда животное съело приманку. Метод применяется почти исключительно на млекопитающих и особенно часто на грызунах. В последнем случае метку можно обнаружить визуально в растущих частях костей [18, 19] или в резцах [20, 21], которые у этой группы животных интенсивно растут всю жизнь. Существует также способ выявления тетрациклинов с помощью хроматографии [22], но он не получил широкого распространения, так как оказался слишком сложным и дорогим. К тому же эта методика подразумевает уничтожение образцов, что не всегда приемлемо. Поэтому простой визуальный поиск маркера по-прежнему остается основным методом, особенно удобным при работе с массовым материалом. При выявлении меченых грызунов присутствие тетрациклина чаще всего определяют или в кости нижней челюсти [1, 23, 24], или в верхнем резце [9–11, 21, 25]. Прямое сравнение этих методик ранее не проводилось. Цель данного исследования заключалась в поиске наиболее эффективной процедуры визуального обнаружения тетрациклиновой метки при массовом мечении грызунов с учетом возможных погрешностей, связанных со спецификой полевой работы и обработки краниального материала.

### Материалы и методики исследования

Сравнение эффективности поиска метки в нижней челюсти или в верхнем резце грызунов выполнено на зверьках различных видов, помеченных приманкой с гидрохлоридом тетрациклина и пойманных летом 2016 г. в лесных массивах на территории г. Екатеринбурга. Отлов мелких млекопитающих проводили стандартным зоологическим методом с соблюдением общепринятых этических норм по отношению к животным. Мечение проводилось неоднократно, поэтому приманка была доступна грызунам в течение трех недель. В ходе пробоподготовки после выварки и очистки черепов делали аншлифы изолированного верхнего резца и одной из половин нижней челюсти вместе с резцом. Выявление тетрациклиновой метки проводили в темной комнате с использованием микроскопа МБС-1 (ЛМО) и УФ осветителя с фильтром УФС-6. Все образцы, в которых обнаружены признаки метки, фотографировали в одном кадре с контрольными для подтверждения. Всего обработано 1 133 черепа.

Проанализировано влияние на выявляемость тетрациклиновой метки двух распространенных практик, применяемых при работе с краниальным материалом, – музейного хранения и обработки черепов пероксидом водорода.

Оценку воздействия фактора времени (музейного хранения) на общий вид в ультрафиолете аншлифов без метки осуществили на основе нашего материала, собранного в Екатеринбурге в 2011–2016 гг., а также в Ильменском заповеднике в 1978 и 2014 гг. Черепа старше 2013 г. хранились в целом виде. Аншлифы от них сделаны специально для данного исследования в начале 2017 г. Для проведения корректных сравнений случайно отобранные пары образцов разного срока хранения размещали в пределах поля зрения микроскопа и фотографировали одним кадром. Дальнейший анализ проводился по фотографиям.

Для изучения изменений, происходящих с тетрациклиновой меткой с течением времени, использован дополнительный материал, полученный в результате однократного мечения в Екатеринбурге в 2013 г. В этом случае приманка была доступна зверькам не более недели. Оценку проводили, сравнивая фотографии образцов, сделанные в одинаковых условиях в 2013 и 2017 гг. При этом в обоих случаях использовали УФ осветитель ОЛД-41 (СПО Светотехника).

Для изучения влияния обработки черепов пероксидом водорода на выявляемость тетрациклиновой метки делались фотографии одних и тех же образцов (4 шт.) до и после соответствующей процедуры. Таблетки гидроперита, истолченные в порошок, заливали 50 мл кипятка, после чего помещали в раствор один верхний резец или целый череп на 30 мин. Перед фотографированием образцы просушивали при комнатной температуре не менее суток.

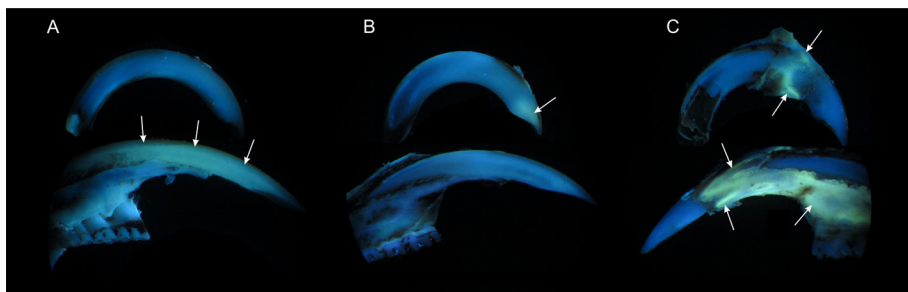
На всех этапах исследования использовали фотоаппарат Canon PowerShot SX220HS (Canon Inc., Япония). Полученные фотографии не подвергались никаким видам цветовой коррекции. Статистическое сравнение пропорций проводили с помощью точного критерия Фишера (двусторонний) в программном пакете StatSoft STATISTICA 6.0. Краниальный материал находится на хранении Музея ИЭРиЖ УрО РАН (г. Екатеринбург).

### Результаты исследования

Сравнение двух способов поиска метки проведено на зверьках, помеченных в естественных условиях в рамках работы по изучению миграционной активности грызунов. Поэтому обстоятельства детекции метки в нашем методическом исследовании полностью аналогичны тем, с которыми сталкиваются зоологи при практическом применении тетрациклиновой методики.

Всего выявлено 223 меченых животных, среди которых отмечены представители всех видов несинантропных грызунов, присутствовавших в выборке 2016 г. из Екатеринбурга: *Sylvaemus uralensis* (Pallas, 1811), *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771), *Myodes glareolus* (Schreber, 1780), *Myodes rutilus* (Pallas, 1779), *Microtus arvalis* (Pallas, 1778), *Microtus agrestis* (Linnaeus, 1761), *Microtus oeconomus* (Pallas, 1776), *Sicista betulina* (Pallas, 1779).

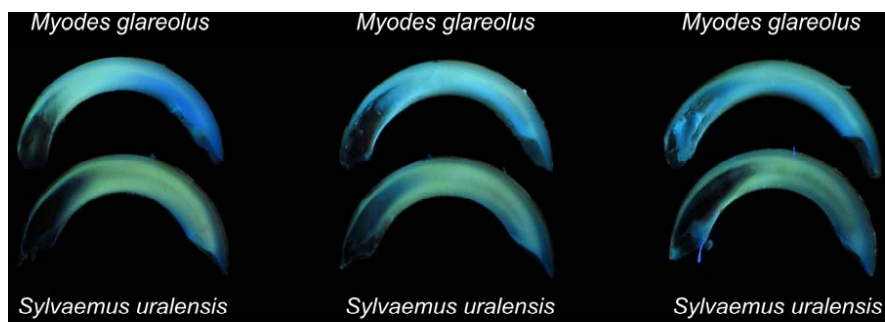
В большинстве случаев тетрациклиновая метка обнаружена как в верхнем, так и в нижнем резце ( $n = 134$ ). У некоторых особей она найдена только в нижнем ( $n = 82$ ) или только в верхнем резце ( $n = 5$ ). В таких случаях метка была неяркой. Метка на кости нижней челюсти выявлена у 100 зверьков. У двух особей (*S. uralensis* и *A. agrarius*) яркая флуоресценция наблюдалась только в кости нижней челюсти при отсутствии метки в резцах (рис. 1).



**Рис. 1.** Проявление тетрациклиновой метки (желтый или желто-зеленый цвет):  
 А – только в нижнем резце *Myodes glareolus*; В – только в верхнем резце *Sylvaemus uralensis*; С – только в костях *Apodemus agrarius*. Фото О.В. Толкачёва и О.Р. Гизуллиной  
 [Fig. 1. View of the tetracycline mark (yellow or yellow-green color):  
 А - In the lower incisor *Myodes glareolus*; В - In the upper incisor *Sylvaemus uralensis*;  
 С - Only in bones of *Apodemus agrarius*. Photo by OV Tolkachev and OR Gizullina]

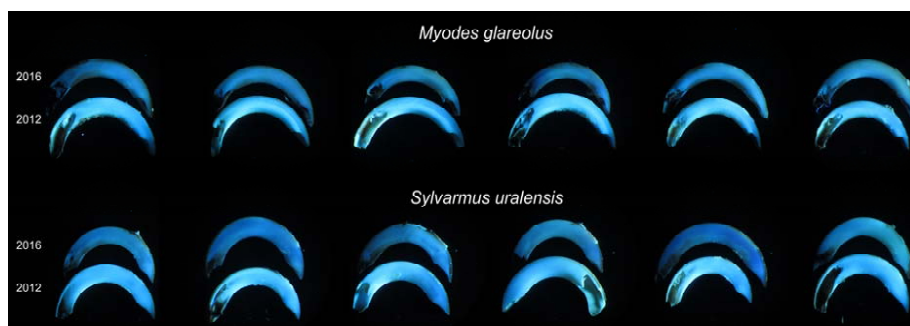
Выявлены некоторые особенности расположения метки в зубной ткани зверьков разных таксонов. Обнаружено, что в верхних резцах полевок флуоресценция проявляется в виде клина, сильно вытянутого в направлении роста зуба и обычно достигающего до окклюзионной поверхности в виде тонкой линии, тогда как у мышей свечение охватывает почти всю ширину шлифа (рис. 2). По нашим наблюдениям, интенсивность флуоресценции в зубах мышей обычно выше, чем у полевок. Случаи, когда метка проявлялась только в нижнем резце, достоверно чаще встречаются у полевок по сравнению с мышами (50 и 27% от меченых полевок и мышей соответственно; точный критерий Фишера,  $p < 0,001$ ).

При сравнении аншлифов верхних резцов **немеченых животных**, отловленных в разные годы (1978, 2011–2016), обнаружено, что все образцы, находящиеся на хранении больше трех лет, значительно светлее более свежих (рис. 3). Эффект проявляется вне зависимости от вида грызуна. Для дополнительной проверки реальности наблюдаемого явления над одним из авторов поставили «слепой эксперимент», в ходе которого испытуемый успешно разделил смешанную выборку образцов 1978 и 2016 гг. с зашифрованными номерами на две соответствующие группы.



**Рис. 2.** Типичное проявление тетрациклиновой метки в аншлифах верхних резцов рыжей полевки (*Myodes glareolus* Schreber, 1780) и малой лесной мыши (*Sylvaemus uralensis* Pallas, 1811). Образцы получены от животных, отловленных на площадке мечения в рамках одного эксперимента. Приманка с тетрациклином экспонировалась в течение трех недель. Фото О.В. Толкачёва и О.Р. Гизуллиной

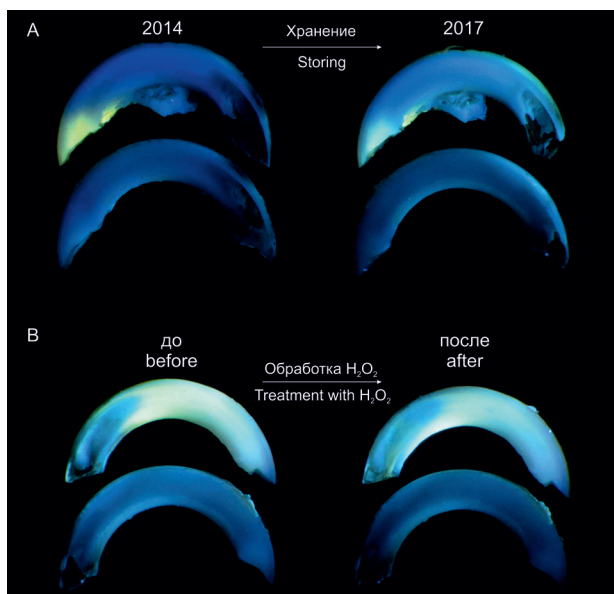
[Fig. 2. Typical manifestation of the tetracycline mark in slices of the upper incisors of bank vole (*Myodes glareolus* Schreber, 1780) and pigmy wood mouse (*Sylvaemus uralensis* Pallas, 1811). Specimens were obtained from animals caught at a marking plot within the same experiment. The bait with tetracycline was exposed for three weeks. Photo by OV Tolkachev and OR Gizullina]



**Рис. 3.** Эффект «осветления» верхних резцов у немеченых животных с течением времени при сравнении случайных выборок образцов 2012 и 2016 гг. Фото О.В. Толкачёва

[Fig. 3. «Lightening» effect appearing in the upper incisors of unmarked animals over time when comparing random samples from 2012 and 2016. Photo by OV Tolkachev]

Сравнительный анализ состояния верхних резцов с тетрациклиновыми метками, выполненный по фотографиям одних и тех же образцов, сделанным в 2013 и 2017 гг., показал, что площадь наблюдаемой флуоресценции и её интенсивность уменьшаются со временем независимо от видовой принадлежности грызуна. Обнаружено, что обработка образцов пероксидом водорода приводит к аналогичному эффекту (рис. 4). Если резцы не извлечены из черепа, то пероксид действует только на те их части, которые выступают из альвеол.



**Рис. 4.** Деградация тетрациклиновой метки в аншлифах верхних резцов со временем и после обработки пероксидом водорода. *А* – вверху один и тот же образец с меткой, сфотографированный в идентичных условиях в 2014 и 2017 гг.; ниже – два контрольных образца за соответствующие годы. *В* – вверху резец с меткой до и после обработки пероксидом водорода; ниже – один и тот же контрольный образец. Фото О.В. Толкачёва

[Fig. 4. Degradation of the tetracycline mark in slices of the upper incisors over time and after treatment with peroxide hydrogen. (A) At the top is the same marked specimen photographed in identical conditions in 2014 and 2017. Below are two control samples for the respective years. (B) At the top is the incisor with the mark before and after treatment with hydrogen peroxide. Below is the same control sample. Photo by OV Tolkachev]

### Обсуждение результатов исследования

Основной целью нашего исследования являлось сравнение эффективности двух методик визуального поиска тетрациклиновой метки у грызунов – в нижней челюсти или в верхнем резце. Существование этих двух подходов связано с историей развития метода в целом. В 1967 г. С. Линхарт и Дж. Кеннели [26] впервые предложили применять тетрациклин в экологических исследованиях. В своей работе они использовали койотов, у которых для анализа брали кости ног, грудину, ребро и половину нижней челюсти. Наиболее заметная флуоресценция наблюдалась в нижней челюсти. Позднее Дж. Криер [23] провел сходное исследование на грызунах. При этом он проводил поиск метки только в нижней челюсти, опираясь на работу предыдущих авторов, и не делал шлифы. Все последующие англоязычные исследователи использовали эту методику. В России применение тетрациклинов для мечения грызунов началось со статьи Г.А. Клевезаль и М.В. Миной [21], в которой авторы определяли метку только в верхнем резце, поскольку об-



разцы получали из неочищенных черепов в полевых условиях, а извлекать нижнюю челюсть в таком случае намного сложнее (Г.А. Клевезаль, личное сообщение). Важным нововведением этих авторов стало приготовление аншлифов резцов, что повысило эффективность детекции метки. В большинстве русскоязычных работ применяется именно этот подход [9–11, 25, 27]. В некоторых случаях дополнительно исследовали различные кости черепа и посткраниального скелета [18, 19]. Мы считаем, что при работе с массовым материалом, обычно получаемым при массовом мечении грызунов, целесообразно работать только с черепом животных, поскольку этот подход лучше всего согласуется с общепринятыми зоологическими методиками, не требуя дополнительных манипуляций с отловленными зверьками.

В ходе исследования мы установили, что у некоторых особей флуоресценция проявляется только в нижнем или только в верхнем резце. Тетрациклиновая метка в нижней челюсти грызунов (резец + кость) проявляется несколько чаще, чем в верхнем резце (218 vs 140 случаев). Соответственно, поиск метки в нижней челюсти на 35,8% эффективнее. Флуоресценцию в костях (100 случаев) мы наблюдали реже, чем в зубах. Кроме того, по нашим наблюдениям, интенсивность флуоресценции на поверхности костей обычно меньше, чем в резцах. В двух образцах метка обнаружена только в костях, но не в зубах. Поскольку оба зверька отловлены спустя 12 недель после мечения, очевидно, что метка в их резцах успела исчезнуть из-за стачивания зубов. Все остальные меченые зверьки отлавливались через 3–6 недель после раскладки приманки с тетрациклином. Два аналогичных случая описаны ранее Е.Ф. Малафеевой [25] на серых полевках. Очевидно, что поиск метки только на поверхности костей черепа был бы в нашем случае крайне неэффективным, вопреки рекомендациям Дж. Криера [23]. Более интенсивное проявление флуоресценции в резцах по сравнению с костями может объясняться тем, что первые, в отличие от последних, у грызунов растут постоянно, а тетрациклин связывается только со свободными ионами кальция, которые в достаточном количестве присутствуют в местах пролиферации минерализованных тканей. Более частое проявление метки в нижних резцах по сравнению с верхними, вероятно, связано с тем, что первые у грызунов растут быстрее [28]. Таким образом, для наиболее полного выявления меченых зверьков целесообразно просматривать аншлифы как верхнего резца, так и нижней челюсти. Предлагаемый комбинированный подход эффективнее поиска метки только в кости нижней челюсти на 55,2%, а по сравнению с просмотром одного верхнего резца – на 37,2%. Обнаруженные различия в паттернах проявления метки в верхних резцах мышей и полевок могут быть связаны как с особенностями строения и роста резцов в семействах *Muridae* и *Cricetidae*, так и с различиями в полученной дозе маркера из-за разных кормовых предпочтений и, соответственно, разного сродства к нашей приманке.

При сравнении общего вида резцов разных лет сбора выяснилось, что образцы, находящиеся на хранении три года и более, выглядят под ультра-

фиолетом заметно светлее, чем свежие, что осложняет диагностику тетрациклиновой метки из-за снижения контрастности по сравнению с фоном. Параллельно происходит деградация самой метки, что заметно по снижению яркости, площади и формы флуоресцирующих участков. Вероятно, наблюдаемый эффект вызван постепенным разрушением остатков органики в зубах (включая хелатные комплексы). Тем же может объясняться и деградация метки под действием перекиси водорода, которая часто применяется для финальной очистки черепов или при работе со старыми, плохо почищенными образцами. Данное предположение косвенно подтверждается тем, что интенсивность флуоресценции тетрациклина в костях сильно снижается после воздействия видимого света, вероятно, тоже за счет разрушения хелатных комплексов [29, цит. по 26]. В связи с этим необходимо отметить, что краниальный материал, использованный в нашем исследовании, хранился в закрытых ящиках, главным образом в подвальном хранилище Музея ИЭ-РиЖ УрО РАН.

### Выводы

Итогом исследования стало обнаружение нескольких факторов, способных существенно повлиять на эффективность визуальной детекции тетрациклиновой метки при массовом мечении грызунов. Сделанные выводы можно представить в виде практических рекомендаций:

1. При работе с краниальным материалом метку следует искать в аншлафах как верхнего резца, так и нижней челюсти.
2. Детекцию нужно проводить в первые три года после очистки черепов.
3. Выборки черепов, в которых планируется искать тетрациклиновую метку, нельзя обрабатывать перексидом водорода.

*Авторы признательны канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории популяционной радиобиологии Е.Б. Григоркиной и канд. биол. наук, н.с. лаборатории палеоэкологии Ю.Э. Кропачевой (Институт экологии растений и животных УрО РАН, г. Екатеринбург) за помощь, оказанную при подготовке рукописи.*

### Литература

1. Lindsey G.D., Nass R.D., Hood G.A. An Evaluation of Bait Stations for Controlling Rats in Sugarcane // The Journal of Wildlife Management. 1971. Vol. 35, № 3. PP. 440–444. doi: [10.2307/3799695](https://doi.org/10.2307/3799695)
2. Slate D., Algeo T.P., Nelson K.M., Chipman R.B., Donovan D., Blanton J.D., Niezgoda M., Rupprecht C.E. Oral Rabies Vaccination in North America: Opportunities, Complexities, and Challenges // PLoS Neglected Trop Diseases. 2009. Vol. 3, № 12. PP. 1–9. doi: [10.1371/journal.pntd.0000549](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000549)
3. Tripp D.W., Rocke T.E., Streich S.P., Brown N.L., Fernandez J. R.-R., Miller M.W. Season and application rates affect vaccine bait consumption by prairie dogs in Colorado and Utah, USA // Journal of Wildlife Diseases. 2014. Vol. 50, № 2. PP. 224–234. doi: [10.7589/2013-04-100](https://doi.org/10.7589/2013-04-100)



4. Рыльников В.А. Зональные особенности сезонных миграций серых крыс (*Rattus norvegicus* Berk.) России в аспекте управления ее численностью // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический. 2007. Т. 112, № 3. С. 13–19.
5. Большаков В.Н., Баженов А.В. Радионуклидные методы мечения в популяционной экологии млекопитающих. М. : Наука, 1988. 158 с.
6. Szacki J., Liro A. Movements of small mammals in the heterogeneous landscape // Landscape ecology. 1991. Vol. 5, № 4. PP. 219–224. doi: [10.1007/BF00141436](https://doi.org/10.1007/BF00141436)
7. Hanski I., Gilpin M. Metapopulation dynamics: brief history and conceptual domain // Biological Journal of the Linnean Society. 1991. Vol. 42. PP. 3–16. doi: [10.1111/j.1095-8312.1991.tb00548.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1991.tb00548.x)
8. Peacock E., Titus K., Garshelis D.L., Peacock M.M., Kuc M. Mark-recapture using tetracycline and genetics reveal record-high bear density // The Journal of Wildlife Management. 2011. Vol. 75, № 6. PP. 1513–1520. doi: [10.1002/jwmg.171](https://doi.org/10.1002/jwmg.171)
9. Григоркина Е.Б., Оленев Г.В. Миграции грызунов в зоне влияния Восточно-Уральского радиоактивного следа (радиобиологический аспект) // Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53, № 1. С. 76–83.
10. Толкачев О.В. Исследование миграций мышевидных грызунов в городской среде // Экология. 2016. № 4. С. 307–312. doi: [10.7868/S0367059716040144](https://doi.org/10.7868/S0367059716040144)
11. Толкачев О.В. Расселение малой лесной мыши (*Sylvemus uralensis* Pallas, 1811) и рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus* Schreber, 1780) в условиях фрагментированного ландшафта // Сибирский экологический журнал. 2016. № 1. С. 137–147. doi: [10.15372/SEJ20160114](https://doi.org/10.15372/SEJ20160114)
12. Fisher P. Review of Using Rhodamine B as a Marker for Wildlife Studies // Wildlife Society Bulletin. 1999. Vol. 27, № 2. PP. 318–329. URL: <http://www.jstor.org/stable/3783897>
13. Smyser T.J., Beasley J.C., Olson Z.H., Rhodes O.E. Jr. Use of Rhodamine B to reveal patterns of interspecific competition and bait acceptance in raccoons // Journal of Wildlife Management. 2010. Vol. 74, № 6. PP. 1405–1416. doi: [10.2193/2009-299](https://doi.org/10.2193/2009-299)
14. Belant J.L., Etter D.R., Mayhew S.L., Visser L.G., Friedrich P.D. Improving large scale mark-recapture estimates for American black bear populations // Ursus. 2011. Vol. 22, № 1. PP. 9–23. URL: <http://www.jstor.org/stable/41304051>
15. Reidy M.M., Campbell T.A., Hewitt D.G. A mark-recapture technique for monitoring feral swine populations // Rangeland Ecology & Management. 2011. Vol. 64, № 3. PP. 316–318. doi: [10.2111/REM-D-10-00158.1](https://doi.org/10.2111/REM-D-10-00158.1)
16. Milch R.A., Rall D.P., Tobie J.E. Bone Localization of the Tetracyclines // Journal of the National Cancer Institute. 1957. Vol. 19, № 1. PP. 87–93.
17. Frost H.M., Villanueva A.R., Roth H., Stanisavljevic S. Tetracycline bone labeling // The Journal of New Drugs. 1961. Vol. 1, is. 5. PP. 195–244. doi: [10.1177/009127006100100503](https://doi.org/10.1177/009127006100100503)
18. Рыльников В.А., Карасева Е.В., Дубинина Н.В. Изучение подвижности серых крыс на рисовых полях Краснодарского края с помощью мечения костей тетрациклином // Грызуны : материалы V всесоюз. совещ. Саратов, 1980. С. 264–265.
19. Лобков В.А. Опыт группового мечения тетрациклином молодых крапчатых сусликов (*Citellus suslicus*) для изучения их расселения // Зоологический журнал. 1984. Т. 63, № 2. С. 309–311.
20. Milch R.A., Rall D.P., Tobie J.E. Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone // The Journal of bone and joint surgery. American volume. 1958. Vol. 40-A, № 4. PP. 897–910. PMID: [13549526](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13549526/)
21. Клевезаль Г.А., Мина М.В. Методика группового мечения грызунов с помощью тетрациклина и возможности ее использования в экологических исследованиях // Зоологический журнал. 1980. Т. 59, № 6. С. 936–941.
22. Рыльников В.А., Николаев Г.М., Ушакова Т.А. Метод мечения костей серых крыс путем комбинирования четырех антибиотиков группы тетрациклина и его применение // Зоологический журнал. 1981. Т. 60, № 9. С. 1411–1414.

23. Crier J.K. Tetracyclines as a fluorescent marker in bones and teeth of rodents // The Journal of Wildlife Management. 1970. Vol. 34, № 4. PP. 829–834. doi: [10.2307/3799151](https://doi.org/10.2307/3799151)
24. Lavoie G.K., Atwell G.C., Swink F.N., Sumangil J.P., Libay J. Movement of the ricefield rat, *Rattus rattus mindanensis*, in response to flooding and plowing as shown by fluorescent bone labeling // Philippine agriculturist. 1971. Vol. 54. PP. 325–330.
25. Малафеева Е.Ф. Об использовании тетрациклина в экологических исследованиях // Экология. 1984. № 3. С. 79–81.
26. Linhart S.B., Kennelly J.J. Fluorescent bone labeling of coyotes with demethylchlortetracycline // The Journal of Wildlife Management. 1967. Vol. 31, № 2. PP. 317–321. doi: [10.2307/3798322](https://doi.org/10.2307/3798322)
27. Гладкина Т.С., Кожевников В.С. Тетрациклин в качестве маркера для изучения расселения обыкновенной полевки // Экология. 1986. № 4. С. 84–86.
28. Зубцова Г.Е. Скорость роста резцов некоторых грызунов // Грызуны : материалы VI Всесоюзного совещания. Л. : Наука. 1983. С. 152–154.
29. Buyske D.A., Eisner H.J., Kelly R.G. Concentration and persistence of tetracycline and chlortetracycline in bone // J. Pharm. and Exptl. Therap. 1960. Vol. 130, № 2. PP. 150–156.

*Поступила в редакцию 29.06.2017 г.; повторно 17.07.2017 г.;  
принята 11.08.2017 г.; опубликована 22.09.2017 г.*

**Авторский коллектив:**

**Толкачёв Олег Владимирович** – канд. биол. наук, н.с. лаборатории функциональной экологии наземных животных Института экологии растений и животных УрО РАН (Россия, 620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202).

E-mail: [olt@mail.ru](mailto:olt@mail.ru)

**Гизуллина Олеся Рафаиловна** – инженер-исследователь лаборатории популяционной экологии и моделирования Института экологии растений и животных УрО РАН (Россия, 620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202).

E-mail: [gizullina\\_or@ipae.uran.ru](mailto:gizullina_or@ipae.uran.ru)

**Оленев Григорий Валентинович** – д-р биол. наук, зав. лабораторией популяционной экологии и моделирования Института экологии растений и животных УрО РАН (Россия, 620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202).

E-mail: [olenev@ipae.uran.ru](mailto:olenev@ipae.uran.ru)

**For citation:** Tolkachev OV, Gizullina OR, Olenev GV. Improved visual detection of tetracycline label for group rodent marking. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2017;39:127-139. doi: 10.17223/19988591/39/8 In Russian, English Summary

**Oleg V. Tolkachev, Olesya R. Gizullina, Grigoriy V. Olenev**

*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Division of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation*

### Improved visual detection of tetracycline label for group rodent marking

Tetracycline is employed in practical and theoretical studies for group marking of animals. Individuals who consume the bait with marker get a label that appears as yellow or yellow-green fluorescence in bones and teeth under UV light. When this approach is used for rodents there are two locations for mark searching: in the mandibular surface (Crier, 1970) or in the polished slice of the upper incisor (Klevezel and Mina, 1980). The aim of this research was to find the most effective procedure for the visual detection of the tetracycline label in the mass marking of rodents, taking into account possible errors related to the specific nature of field work and the processing of cranial material.

We compared the efficacy of mark searching in the lower jaw or the upper incisor using different rodent species that were marked with bait containing tetracycline hydrochloride and then captured during the summer 2016 in the forest stands near Yekaterinburg, Russia. We made polished slices of both the isolated upper incisor and the branch of *mandibulae* with incisor in the course of sample preparation. Detection of tetracycline label was carried out in the dark room by microscope under UV light. If a mark was suspected, we took a picture of that specimen together with a reference one in the same frame. Numbers of involved individuals were 1133. To assess the influence of time factor (museum storing) on a general view of slices under UV we compared upper incisors from animals without tetracycline label, which were caught in different years (1978-2016). Comparisons of randomly selected pairs from samples of different storage time were placed within the microscope field of view and photographed as one frame. Alterations of tetracycline marks in time were estimated by comparing images of the upper incisors taken under the same conditions in 2013 and 2017. To assess the impact of peroxide hydrogen on the detectability of tetracycline label we made photos of the same specimens (4 ind.) before and after the procedure. This study was carried out on abundant and not threatened species of small mammals. Our institution (Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences) has a special permission for such work. We did not use any unusual protocols that could contradict the generally accepted standards of animal care.

Basing on the analysis of extensive cranial material, we showed that the existing methods of visual diagnostics of the tetracycline mark in rodents is not reliable enough. In some cases, the label can only appear in the upper or lower incisors. On the surface of the bone of the lower jaw fluorescence is usually less intense than in the teeth, but in two cases a distinct mark was found only in bones, due to the fact that ever-growing incisors had time to be grinded (Fig. 1). To increase the probability of label detection it is necessary to search for specific fluorescence under UV light in slices of both the upper incisor and the lower jaw. The improved method gives the increment of efficiency from 37% to 55%. We revealed differences in tetracycline label expression between voles and mice (Fig. 2). In the upper incisors of the voles, fluorescence manifests itself in the form of a wedge that is strongly elongated in the direction of tooth growth, usually reaching the occlusal surface in the form of a thin line, whereas in mice the yellow glow covers almost the entire width of the section. Cases when the mark appears only in the lower incisor more often occur in voles than in mice (50% vs 27%). It was found that over time teeth from any boiled and cleaned skulls become lighter under UV, which complicates the diagnosis (Fig. 3). The intensity of label fluorescence in incisors also gradually reduced (Fig. 4). The critical storage period for skulls was ascertained - three years, after which the identification of the mark becomes quite difficult. We discovered that treatment with hydrogen peroxide, which is often used for cleaning rodent skulls, impairs the visibility of the tetracycline mark (Fig. 4). In conclusion, we propose three practical recommendations for detection of tetracycline label in rodents: 1) Search for yellow or yellow-green fluorescence in slices of both the upper incisor and the lower jaw; 2) Detection should be done during the first three years after skull clearing; 3) Samples, which were designated to mark detection, should never be treated with hydrogen peroxide.

**Acknowledgments:** The authors thank Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher of Laboratory of Population Radiobiology EB Grigorkina and Cand. Sci. (Biol.), Researcher of Laboratory of Paleoecology YE Kropacheva (Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences), for help in manuscript preparation.

*The article contains 4 Figures, 29 References.*

**Key words:** *Apodemus agrarius*; *Microtus agrestis*; *Microtus arvalis*; *Microtus oeconomus*; *Myodes glareolus*; *Myodes rutilus*; *Sicista betulina*; *Sylvaeus uralensis*.

### References

1. Lindsey GD, Nass RD, Hood GA. An evaluation of bait stations for controlling rats in sugarcane. *The Journal of Wildlife Management*. 1971;35(3):440-444. doi: [10.2307/3799695](https://doi.org/10.2307/3799695)
2. Slate D, Algeo TP, Nelson KM, Chipman RB, Donovan D, Blanton JD, Niezgod M, Rupprecht CE. Oral rabies vaccination in North America: Opportunities, complexities, and challenges. *PLoS Neglected Trop Diseases*. 2009;3(12):1-9. doi: [10.1371/journal.pntd.0000549](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000549)
3. Tripp DW, Rocke TE, Streich SP, Brown NL, Fernandez JR-R, Miller MW. Season and application rates affect vaccine bait consumption by prairie dogs in Colorado and Utah, USA. *Journal of Wildlife Diseases*. 2014;50(2):224-234. doi: [10.7589/2013-04-100](https://doi.org/10.7589/2013-04-100)
4. Rylnikov VA. Zonal peculiarities of seasonal migrations of the norwegian rat (*Rattus norvegicus* Berk.) in Russia in view of species population management. *Bulletin of Moscow Society of Naturalists. Biological Series*. 2007;112(3):13-19. In Russian
5. Bol'shakov VN, Bazhenov AV. Radionuklidnye metody mecheniya v populyatsionnoy ekologii mlekopitayushchikh [Radionuclide labeling in population ecology of mammals]. Moscow: Nauka Publ.; 1988. 158 p. In Russian
6. Szacki J, Liro A. Movements of small mammals in the heterogeneous landscape. *Landscape ecology*. 1991;5(4):219-224. doi: [10.1007/BF00141436](https://doi.org/10.1007/BF00141436)
7. Hanski I, Gilpin M. Metapopulation dynamics: brief history and conceptual domain. *Biological Journal of the Linnean Society*. 1991;42:3-16. doi: [10.1111/j.1095-8312.1991.tb00548.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1991.tb00548.x)
8. Peacock E, Titus K, Garshelis DL, Peacock MM, Kuc M. Mark-recapture using tetracycline and genetics reveal record-high bear density. *The Journal of Wildlife Management*. 2011;75(6):1513-1520. doi: [10.1002/jwmg.171](https://doi.org/10.1002/jwmg.171)
9. Grigorkina EB, Olenov GV. Migration of rodents in the Eastern Urals radioactive trace zone (Radiobiological aspect). *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2013;53(1):76-83. doi: [10.7868/80869803112060045](https://doi.org/10.7868/80869803112060045) In Russian
10. Tolkahev OV. A study on the migrations of murine rodents in urban environments. *Russian Journal of Ecology*. 2016;47(4):399-404. doi: [10.1134/S1067413616040147](https://doi.org/10.1134/S1067413616040147)
11. Tolkahev OV. The dispersal of the pygmy wood mouse (*Sylvaeus uralensis* Pallas, 1811) and the bank vole (*Clethrionomys glareolus* Schreber, 1780) in a fragmented landscape. *Contemporary Problems of Ecology*. 2016;9(1):116-124. doi: [10.1134/S1995425516010157](https://doi.org/10.1134/S1995425516010157)
12. Fisher P. Review of using Rhodamine B as a marker for wildlife studies. *Wildlife Society Bulletin*. 1999;27(2):318-329. Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/3783897>
13. Smyser TJ, Beasley JC, Olson ZH, Rhodes OE Jr. Use of Rhodamine B to reveal patterns of interspecific competition and bait acceptance in raccoons. *Journal of Wildlife Management*. 2010;74(6):1405-1416. doi: [10.2193/2009-299](https://doi.org/10.2193/2009-299)
14. Belant JL, Etter DR, Mayhew SL, Visser LG, Friedrich PD. Improving large scale mark-recapture estimates for American black bear populations. *Ursus*. 2011;22(1): 9-23. Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/41304051>
15. Reidy MM, Campbell TA, Hewitt DG. A mark-recapture technique for monitoring feral swine populations. *Rangeland Ecology & Management*. 2011;64(3):316-318. doi: [10.2111/REM-D-10-00158.1](https://doi.org/10.2111/REM-D-10-00158.1)
16. Milch RA, Rall DP, Tobie JE. Bone localization of the tetracyclines. *Journal of the National Cancer Institute*. 1957;19(1):87-93. PMID: [13502708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13502708/)
17. Frost HM, Villanueva AR, Roth H, Stanisavljevic S. Tetracycline bone labeling. *The Journal of New Drugs*. 1961;1(5):195-244. doi: [10.1177/009127006100100503](https://doi.org/10.1177/009127006100100503)

18. Ryl'nikov VA, Karaseva EV, Dubinina NV. Izuchenie podvizhnosti serykh kry's na risovykh polyakh Krasnodarskogo kraia s pomoshch'yu mecheniya kostey tetratsiklinom [Studying the mobility of gray rats in rice fields of Krasnodar Krai with the help of tetracycline bone labeling]. In: *Gryzuny. Materialy V vsesoyuznogo soveshchaniya* [Rodents. Proc. of the V All-Union Conf (Saratov, Russia, 3-5 December, 1980)]. Moscow: Nauka Publ.; 1980. pp. 264-265. In Russian
19. Lobkov VA. Opyt gruppovogo mecheniya tetratsiklinom molodykh krapchatykh suslikov (*Citellus suslicus*) dlya izucheniya ikh rasseleniya [Experience of group tetracycline labeling young *Citellus suslicus* to study their distribution]. *Zoologicheskii zhurnal*. 1984;63(2):309-311. In Russian
20. Milch RA, Rall DP, Tobie JE. Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*. 1958;40-A(4):897-910. PMID: [13549526](#)
21. Klevezal GA, Mina MV. Metodika gruppovogo mecheniya gryzunov s pomoshch'yu tetratsiklina i vozmozhnosti ee ispol'zovaniya v ekologicheskikh issledovaniyakh [Group labeling of rodents using tetracycline and its possible use for ecological studies]. *Zoologicheskii zhurnal*. 1980;59(6):936-941. In Russian
22. Ryl'nikov VA, Nikolaev GM, Ushakova TA. Metod mecheniya kostey serykh kry's putem kombinirovaniya chetyrekh antibiotikov gruppy tetratsiklina i ego primeneniye [A tetracycline method of group marking for rodents and prospect of its utilization in ecological studies]. *Zoologicheskii zhurnal*. 1981;60(9):1411-1414. In Russian
23. Crier JK. Tetracyclines as a fluorescent marker in bones and teeth of rodents. *The Journal of Wildlife Management*. 1970;34(4):829-834. doi: [10.2307/3799151](#)
24. Lavoie GK, Atwell GC, Swink FN, Sumangil JP, Libay J. Movement of the ricefield rat, *Rattus rattus mindanensis*, in response to flooding and plowing as shown by fluorescent bone labeling. *The Philippine agriculturist*. 1971;54:325-330.
25. Malafeeva EF. Ob ispol'zovanii tetratsiklina v ekologicheskikh issledovaniyakh [On using tetracycline in environmental studies]. *Ekologiya*. 1984;(3):79-81. In Russian
26. Linhart SB, Kennelly JJ. Fluorescent bone labeling of coyotes with demethylchlortetracycline. *The Journal of Wildlife Management*. 1967;31(2):317-321. doi: [10.2307/3798322](#)
27. Gladkina TS, Kozhevnikov VS. Tetratsiklin v kachestve markera dlya izucheniya rasseleniya obyknovennoy polevki [Tetracycline as a marker for studying the distribution of ordinary voles]. *Ekologiya*. 1986;(4):84-86. In Russian
28. Zubtsova GE. Skorost' rosta reztsov nekotorykh gryzunov [Incisor growth rate in some rodents]. In: *Gryzuny. Materialy VI Vsesoyuznogo soveshchaniya* [Rodents. Proc. of the VI All-Union Conf.]. Leningrad: Nauka Publ.; 1983. pp. 152-154. In Russian
29. Buyske DA, Eisner HJ, Kelly RG. Concentration and persistence of tetracycline and chlortetracycline in bone. *J Pharmacol Exp Ther*. 1960;130(2):150-156. PMID: [13689513](#)

Received 29 June 2017; Revised 17 July 2017;

Accepted 11 August 2017; Published 22 September 2017

**Author info:**

**Tolkachev Oleg V**, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Functional Ecology of Terrestrial Animals, Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 202a 8 Marta Str., Yekaterinburg 620130, Russian Federation.

E-mail: [olt@mail.ru](mailto:olt@mail.ru)

**Gizullina Olesya R**, Research Engineer, Laboratory of Population Ecology and Modeling, Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 202a 8 Marta Str., Yekaterinburg 620130, Russian Federation.

E-mail: [gizullina\\_OR@ipae.uran.ru](mailto:gizullina_OR@ipae.uran.ru)

**Olenev Grigoriy V**, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Population Ecology and Modeling, Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 202a 8 Marta Str., Yekaterinburg 620130, Russian Federation.

E-mail: [olenov@ipae.uran.ru](mailto:olenov@ipae.uran.ru)