

УДК: 619:615.9

З.Г. ГОРБЕНКО, аспірант*

Інститут животноводства НААН України

Влияние нутриентов и поверхностно-активных веществ на адсорбцию Т-2 токсина гидролизным лигнином

Досліджено адсорбцію Т-2 токсину (15,5 мкг/мл) гідролізним лігніном (37,5 мг/мл) з водних розчинів нутрієнтів та поверхнево-активних речовин. Адсорбція склала 73, 66, 43, 40 та 32% відповідно з води, розчинів амінокислот, жовчі, твіну 20 та комбінованого розчину нутрієнтів та жовчі (вміст етанолу у розчинах 0,5% об'єму). Зроблено висновок, що присутність у складі розчину нутрієнтів та, особливо, натуральних або синтетичних поверхнево-активних речовин знижує адсорбцію Т-2 токсину гідролізним лігніном.

Т-2 токсин, адсорбенти мікотоксинів, гідролізний лігнін, ефективність адсорбентів мікотоксинів

Потребность производителей животноводческой продукции, в частности птицеводческих хозяйств, являющихся ведущими производителями мяса на Украине, в методах предупреждения негативных последствий скармливания контаминированных микотоксинами кормов привела к появлению на рынке целого спектра препаратов, предназначенных для профилактики микотоксикозов животных.

Одним из механизмов действия данных препаратов является энтеросорбция микотоксинов – уменьшение их биодоступности в пищеварительном тракте за счет адсорбции на поверхности препарата. Метод энтеросорбции широко применяется в медицине и ветеринарии для лечения острых и хронических отравлений различной этиологии. Особенностью использования энтеросорбции в качестве метода профилактики микотоксикозов является введение энтеросорбентов в корм на протяжении значительной части периода выращивания животных. Это затрудняет введение энтеросорбентов на уровне более нескольких процентов от массы корма, выдвигает жесткие требования к специфичности, безопасности и другим характеристикам энтеросорбентов.



Значительные успехи были достигнуты при использовании в качестве энтеросорбентов алюмосиликатов для профилактики афлатоксикозов.

Однако, использование энтеросорбентов при интоксикациях, вызванных некоторыми другими микотоксинами, в частности, Т-2 токсином, может быть малоэффективным [1,2,4]. Замечено, что энтеросорбенты, эффективно связывающие микотоксины в вод-

ных растворах, могут оказываться неэффективными *in vivo* [1,3,5,6], что особенно ярко выражено в случае использования активированных углей [7]. Способность препарата инактивировать микотоксины *in vitro* также не гарантирует, что улучшение показателей продуктивности животных, вызванное введением препарата в контаминированные корма, связано непосредственно с инактивацией микотоксинов [8].

Причиной подобных расхождений могут быть как различия *in*

* Науковий керівник – кандидат біологічних наук О.В. Труфанов.

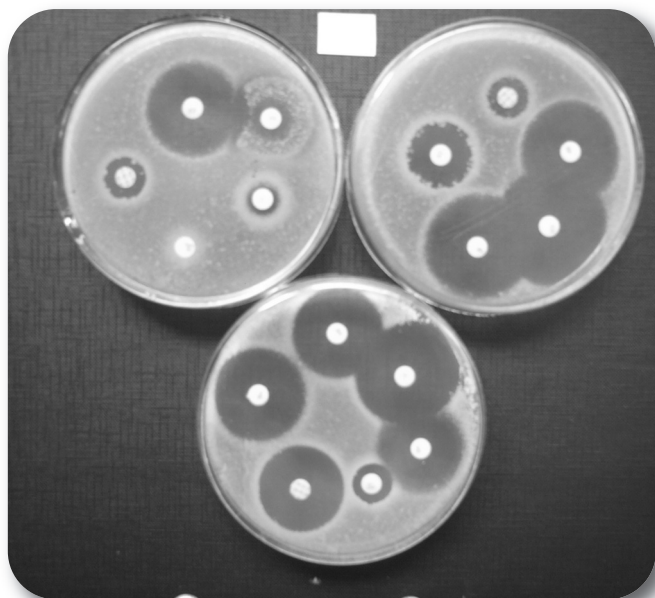


Рис. Метод дисков

1. Состав водных растворов, в которых изучали адсорбцию Т-2 токсина

Раствор	Состав растворов						
	этанол, %	аминокислоты	сахара	липиды	экстракт комбикорма	желчь	Твин 20
А	5	-	-	-	-	-	-
Б	0,5	-	-	-	-	-	-
В		+	-	-	-	-	-
Г		+	+	+	+	-	-
Д		-	-	-	-	+	-
Ж		+	+	+	+	+	-
З		-	-	-	-	-	+

vivo и *in vitro* условий, в которых протекает адсорбция, так и наличие у препарата, используемого в качестве энтеросорбента других полезных (иммуномодулирующих, адаптогенных и др.) или вредных (связывание нутриентов и т.п.) свойств. Такая ситуация затрудняет сравнение адсорбентов микотоксинов и, соответственно, усложняет поиск и разработку более эффективных разновидностей данных препаратов. Поэтому интерес представляет изучение влияния условий, в которых происходит адсорбция, на эффективность связывания микотоксинов.

Целью данной работы было изучение влияния присутствия в растворе этанола, нутриентов, натуральных и синтетических ПАВ на адсорбцию Т-2 токсина гидролизным лигнином.

Материалы и методы. В работе был использован препарат гидролизного лигнина “Полифепан” производства “Экосфера” (Россия).

Концентрацию Т-2 токсина в растворах измеряли диск-диффузионным методом [9], в качестве тест-организма использовали *Candida pseudotropicalis* 44 пк; питательной средой служил сусло-агар с 0,08 мг/мл 1-нафтилацетата. Растворы, в которых измеряли концентрацию Т-2 токсина, наносили по 5 мкл на бумаж-

ные диски диаметром 6 мм (рис.). В одноразовые полистироловые чашки Петри заливали по 5 мл питательной среды. После засева питательной среды тест-организмом на ее поверхность наносили упомянутые выше бумажные диски и инкубировали чашки в термостате при температуре 34 °С в течение 14-16 часов. Учитывали диаметры зон ограниченного роста (ЗОР), образующихся вокруг бумажных дисков. Зависимость между диаметром ЗОР и количеством токсина на диске определяли по калибровочному графику.

Было проведено два эксперимента.

Целью эксперимента 1 было изучение влияния состава анализируемых растворов на чувствительность тест-организма к Т-2 токсину. Для этого, диски обрабатывали сначала растворами нутриентов или ПАВ (5 или 10 мкл), а затем раствором Т-2 токсина с концентрацией 15,5 мкг/мл (5 или 2 мкл). В качестве контроля использовали диски, обработанные только раствором Т-2 токсина.

Целью эксперимента 2 было изучение влияния состава раствора на адсорбцию Т-2 токсина гидролизным лигнином. Проводили адсорбцию в герметично закрытых плоскодонных колбах в течение трех часов при температуре

42 °С и периодическом взбалтывании. Т-2 токсин вводили в виде раствора в этиловом спирте. Гидролизный лигнин вводили в растворы на уровне 37,5 и 75 мг/мл. После проведения адсорбции растворы центрифугировали, надосадочную жидкость декантировали, осадок отбрасывали, для анализа концентрации Т-2 токсина использовали оставшуюся жидкую фазу. В качестве контроля использовали растворы без адсорбента. Все манипуляции с контрольными и опытными растворами проводились параллельно, диски обработанные соответствующими опытными и контрольными растворами располагались на одной чашке Петри. Процент адсорбции рассчитывали относительно контроля.

В экспериментах использовали растворы (табл. 1), содержавшие:

- аминокислоты: DL-валин, L-изо-лейцин, DL-лейцин, DL-лизин, DL-метионин, DL-треонин, DL-триптофан и DL-фенилаланин, по 0,5 г/л каждой аминокислоты;
- сахара: 1,3 г/л D-глюкозы и 14 г/л сахарозы;
- липиды: растительное масло – 40 мл/л;
- экстракт комбикорма: экстрагировали полнорационный комбикорм для цыплят дистиллированной водой (200 г комбикорма / 1 л воды) в течение 12 часов, после чего фильтровали смесь

2. Регистрируемое количество токсина на дисках, обработанных 5 мкл раствора Т-2 токсина, нг/диск ($M \pm s$, $n=7$)

Контроль	Диски, обработанные растворами				
	Г	Д	Ж	З	Твин 20, 20 мл/л
88,3 ^a ±7,8	Диски, обработанные 10 мкл растворов				
	80,3 ^a ±9,5	79,7 ^a ±12,1	89,1 ^a ±7,1	92,8 ^a ±12,3	55,2 ^b ±3,7
	Диски, обработанные 5 мкл растворов				
	94,5 ^a ±7,7	91,5 ^a ±10,5	92,2 ^a ±6,3	93,5 ^a ±8,9	69,3 ^b ±5,8

Примечание: здесь и в следующих таблицах различия между значениями в столбцах, не имеющими общих индексов, статистически значимы, $P \leq 0,05$.

3. Регистрируемое количество токсина на дисках, обработанных 2 мкл раствора Т-2 токсина, нг/диск ($M \pm s$, $n=7$)

Контроль	Диски, обработанные растворами				
	Г	Д	Ж	З	Твин 20, 20 мл/л
34,8 ^{a,c} ±4,3	Диски, обработанные 10 мкл растворов				
	40,5 ^a ±7,5	36,5 ^{a,c} ±3,6	39,8 ^{a,c} ±5,8	31,9 ^c ±1,9	23,4 ^b ±1,9
	Диски, обработанные 5 мкл растворов				
	40,0 ^a ±7,5	38,0 ^{a,b} ±5,8	36,3 ^{a,b} ±6,3	34,8 ^{a,b} ±3,6	29,5 ^b ±3,5

4. Концентрация Т-2 токсина в контрольных и опытных растворах при введении 37,5 мг/мл лигнина ($M \pm s$, $n=4$)

Раствор	Концентрация Т-2 токсина, мкг/мл		Адсорбция, %
	контроль	опыт	
А	16,3±2,7 ^{a,b}	7,2±2,6 ^{a,b}	57±9 ^{a,b}
Б	14,6±1,7 ^{a,b}	3,9±0,7 ^{a,c}	74±3 ^a
В	17,9±1,5 ^{a,b}	6,0±0,8 ^{a,c,b}	66±6 ^{a,c}
Г	13,2±0,5 ^a	6,25±1,1 ^{b,c}	52±10 ^{b,c}
Д	17,6±2,1 ^{a,b}	10,0±0,8 ^{b,d}	43±6 ^{b,d}
Ж	13,4±2,3 ^a	9,2±2,0 ^{b,d}	32±5 ^d
З	19,3±2,3 ^b	11,5±1,0 ^d	40±9 ^{b,d}

через бумажный фильтр. Использовали профильтрованную жидкую фазу;

– желчь цыплят-бройлеров, 100 мл/л;

Твин 20 (Полиоксиэтилен-сорбитанмонолаурат), 5 мл/л.

Статистическую обработку проводили с помощью критерия множественных сравнений Шеффе.

Результаты и обсуждение.

При проведении первого эксперимента изучили влияния состава анализируемых растворов на чувствительность тест-организма к Т-2 токсину.

Поскольку анализируемые растворы содержали ПАВ, а также вещества, используемые представителями рода *Candida* в качестве источников энергии, азота и углерода, было изучено влияние состава данных растворов на показания используемого метода.

В таблицах 2 и 3 представлены результаты измерения количества Т-2 токсина на дисках, обработанных соответствующими растворами нутриентов и ПАВ, а затем 5 мкл (табл. 2) либо 2 мкл (табл. 3) раствора Т-2 токсина.

Как следует из данных таблиц 2 и 3, значимых различий между регистрируемыми количествами Т-2 токсина на бумажных дисках, обработанных растворами Г, Д, Ж, З и контролем обнаружено не было. Однако, регистрируемые количества Т-2 токсина на дисках, обработанных раствором, содержащим 20 мл/л Твина 20, оказались значимо заниженными. Можно предположить, что Твин 20, являясь ПАВ, увеличивает растворимость и, следовательно, облегчает диффузию Т-2 токсина в питательной среде, уменьшая при этом его концентрацию в непосредственной близости от диска, что и приводит к уменьшению диаметра ЗОР.

Во втором эксперименте изучили влияния состава растворов на адсорбцию Т-2 токсина. Результаты измерения концентрации Т-2 токсина в растворах А, Б, В, Г, Д, Ж и З в отсутствии (контроль) или присутствии (опыт) гидролизного лигнина, а также про-

цент адсорбированного токсина приведены в таблицах 4 и 5.

При введении 37,5 мг/мл лигнина присутствие в растворе желчи, смеси нутриентов и желчи, а также Твина 20 снижало адсорбцию по сравнению с водно-этанольным раствором (Б) соответственно в 1,7; 2,4 и 1,9 раза. В присутствии смеси нутриентов (раствор Г) адсорбция снижалась в 1,4 раза. Присутствие только аминокислот либо повышение концентрации этанола также приводило к снижению процента адсорбции, которое, однако, не было значимым по сравнению с раствором Б.

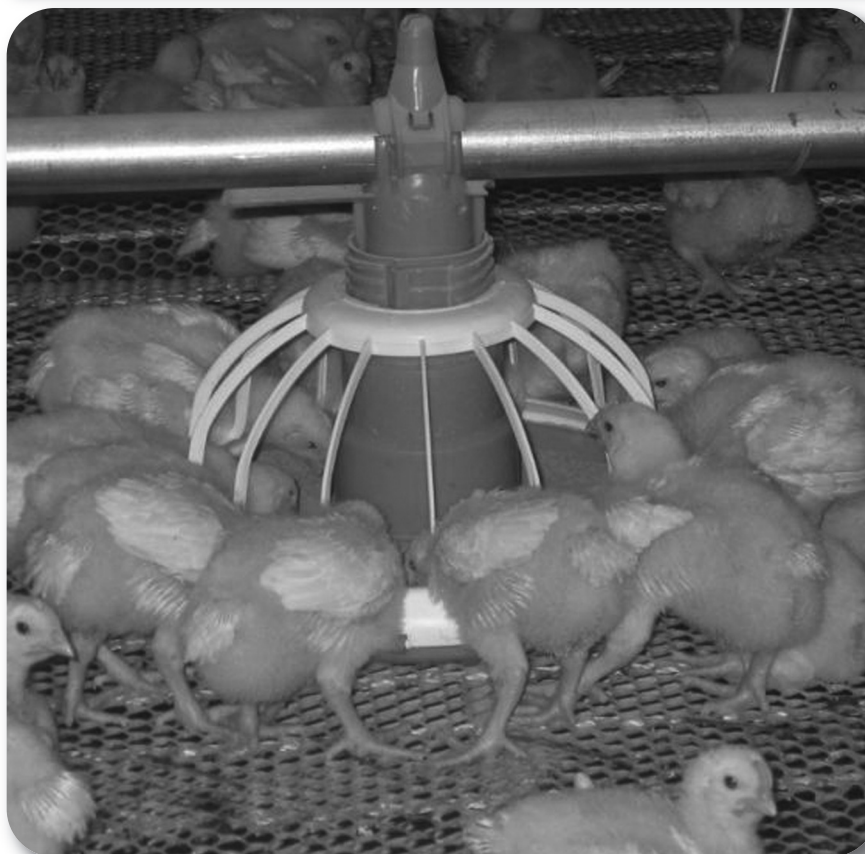
При введении в растворы удвоенного количества лигнина (таблица 4) в растворах А, Б и В процент адсорбции превышал предел обнаружения (данные не приведены). Присутствие в растворе желчи, либо смеси нутриентов и желчи снижало процент адсорбции по сравнению с раствором Г соответственно в 1,3 и 1,5 раза.

Снижение адсорбции Т-2 токсина в присутствии нескольких адсорбтивов очевидно объясняется их конкурентной адсорбцией на поверхности адсорбента. Выраженная способность ПАВ снижать адсорбцию Т-2 токсина гидролизным лигнином может быть обусловлена, во-первых: их способностью концентрироваться на границе раздела фаз сорбент/раствор, что усиливает конкурентную адсорбцию ПАВ; во-вторых: поскольку Т-2 токсин является слаборастворимым в воде веществом, его сольubilизация посредством ПАВ может влиять на адсорбцию в соответствии с известным эмпирическим правилом: "чем лучше растворимость, тем хуже адсорбция". Наблюдаемое снижение адсорбции в растворе А также может быть обусловлено улучшением растворимости Т-2 токсина при повышении концентрации этанола в растворе.

Во многих отечественных и зарубежных работах при исследовании активности энтеросорбентов *in vitro* с целью имитации

5. Концентрация Т-2 токсина в контрольных и опытных растворах при введении 75 мг/мл лигнина ($M \pm s$, $n=4$)

Раствор	Концентрация Т-2 токсина, мкг/мл		Адсорбция, %
	контроль	опыт	
Г	13,0±2,2 ^a	3,0±0,3 ^a	74±6 ^a
Д	15,2±1,5 ^a	6,0±0,5 ^b	56±8 ^b
Ж	15,8±5,2 ^a	8,2±4,0 ^b	50±8 ^b
З	19,4±1,6 ^a	6,3±0,8 ^b	67±6 ^a



условий пищеварительного тракта, адсорбция и десорбция микотоксинов проводилась в растворах с различными значениями рН, в присутствии компонентов корма и т.п. Влияние ПАВ на адсорбцию имитировалось лишь в отдельных работах, например, при использовании "гастроинтестинальных моделей" для исследования активности энтеросорбентов микотоксинов. Интересно отметить, что результаты, полученные с помощью "гастроинтестинальных моделей", согласуются с результатами исследований *in vivo* [10]. Однако, поскольку целью

использования этих моделей является возможно более полная имитация всей гаммы условий пищеварительного тракта, эти модели сложны и пока не получили значительного распространения.

Способность ПАВ желчи снижать адсорбцию Т-2 токсина гидролизным лигнином, позволяет предположить возможность подобного влияния на адсорбцию Т-2 токсина другими адсорбентами и, таким образом, может указывать на одну из причин расхождений между *in vivo* и *in vitro* исследованиями. При оценке и сравнении адсорбентов микоток-



синов в *in vitro* условиях, целесообразным может быть введение ПАВ и нутриентов в растворы, из которых проводится адсорбция.

Выводы

1. Присутствие ПАВ и нутриентов в растворах снижает адсорбцию Т-2 токсина гидролизным лигнином более чем в 2 раза по сравнению с водным раствором.

2. При *in vitro* оценке энтеросорбентов микотоксинов целесообразно имитировать влияние ПАВ и нутриентов.

3. Перспективы дальнейших исследований – изучение влияния нутриентов и ПАВ на адсорбцию микотоксинов другими энтеросорбентами.

Изучена адсорбция Т-2 токсина (15,5 мкг/мл) гидролизным лигнином (37,5 мг/мл) из водных растворов нутриентов и поверхностно-активных веществ. Адсорбция составила 73, 66, 43, 40 и 32% соответственно из воды, растворов аминокислот, желчи, Твина 20 и комбиниро-

ванного раствора нутриентов и желчи (содержание этанола в растворах 0,5% объема). Сделан вывод, что присутствие в составе раствора нутриентов и, особенно, натуральных или синтетических поверхностно-активных веществ снижает адсорбцию Т-2 токсина гидролизным лигнином.

Т-2 токсин, адсорбенты микотоксинов, гидролизный лигнин, эффективность адсорбентов микотоксинов

The adsorption of T-2 toxin (15,5 µg/ml) by lignin (37,5 mg/ml) from water solutions of nutrients and surfactants was investigated. The adsorption amounted 73, 66, 43, 40 and 32% correspondingly from water, solutions of amino acids, bile, Tween 20 and combined solution of nutrients and bile (ethanol concentration in solutions 0,5% vol.). So, the presence of nutrients and especially natural or synthetic surfactants can decrease the adsorption of T-2 toxin by lignin.

T-2 toxin, mycotoxin binders, lignin, efficacy of mycotoxin binders

Литература

1. Efficacy of various inorganic sorbents to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens [Text] / R.H.Bailey, L.F.Kubena, R.B.Harvey, S.A.Buckley [et al.] // Poultry Science. — 1998. — №77. — P. 1623–1630.

2. Effects of hydrated sodium calcium aluminosilicate (T-bind) on mycotoxicosis in young broiler chickens / L.F.Kubena, R.B.Harvey, R.H.Bailey [et al.] // Poultry science. — 1998. — №77. — P. 1502-1509.

3. Effects of inorganic adsorbents and cyclopiazonic acid in broiler chickens [Text] / M.R.Dwyer, L.F.Kubena, R.B.Harvey, K.Mayura [et al.] // Poultry science. — 1997. — №.76. — P. 1141-1149.

4. Influence of a superactivated charcoal on the toxic effects of aflatoxin or T-2 toxin in growing broilers / T.S.Edrington, L.F.Kubena, R.B.Harvey [et al.] // Poultry science. — 1997. — №76. — P. 1205-1211.

5. Investigation of organophilic montmorillonite clay inclusion in zearalenone-contaminated diets using the mouse uterine weight bioassay / S.L.Lemke, K.Mayura, W.R.Reeves, N.Wang [et al.] // J.Toxicol. Environ. Health. — 2001. — №62 (4). — P. 243–581.

6. Discrepancies between *in vitro* and *in vivo* aflato-

xin binding [Internet resource] / J.N.Broomhead [et al.] // Available at: http://www.amlan.com/downloads/ASAS_CAAV_09_Vivo.pdf

7. Rotter R.G. Influence of dietary charcoal on ochratoxin A toxicity in leghorn chicks / R.G.Rotter, A.A.Frohlich, R.R.Marquardt // Can. j. vet. res. — 1989. — №53. — P. 449-453.

8. Effect of addition of a detoxifying agent to laying hen diets containing uncontaminated or Fusarium toxin-contaminated maize on performance of hens and on carryover of zearalenone / S.Danicke, K.H.Uberschar, I.Halle, S.Matthes [et al.] // Poultry science. — 2002. — №81. — P. 1671-1680.

9. Труфанов О.В. НТ-2 токсин: мікробіологічний метод визначення, розповсюдженість, токсичність та застосування препаратів *Bacillus subtilis* при НТ-2 токсикозі курей [Текст] : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец: 03.00.07 "Мікробіологія" / О.В.Труфанов – Львів, 2009. – 20 с.

10. Avantaggiato G. Recent advances on the use of adsorbent materials for the detoxification of Fusarium mycotoxins / G.Avantaggiato, M.Solfrizzo, A.Visconti // Food. Addit. Contam. — 2005. — №22(4). — P. 379-388.