

УДК 619:615.918:636.5.085

М. Є. РУДА

О. М. ВАСЯНОВИЧ, кандидат сільськогосподарських наук

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

ВИВЧЕННЯ ДЕТОКСИКАЦІЙНОЇ ДІЇ СОРБЕНТНИХ ПРЕПАРАТІВ INVITRO ВІДНОСНО КУЛЬТУРИ ГРИБІВ-ПРОДУЦЕНТІВ МІКОТОКСИНІВ

*У статті висвітлені результати дослідження invitro 18 сорбентів відносно активних штамів грибів-продуцентів *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium urticae*, *Fusarium sporotrichioides* var. *roae*. Встановлений ступінь детокси-кації найбільш ефективних іноземних та вітчизняних сорбентів.*

Ключові слова: мікотоксини, гриби-продуценти, сорбенти, стеригматоцистин, афлатоксин В1, патулін, Т-2 токсин.

За останні роки спостерігається тенденція до підвищення забруднення зерна і продуктів його переробки мікотоксинами, що є проявом екологічної кризи, внаслідок порушення сформованої тисячоліттями рівноваги.

Ураження зерна мікроскопічними грибами може відбуватися в полі під час вирощування зернових та при їх зберіганні. Це зумовлено широким розповсюдженням грибів у природі та біологічними властивостями зерна, що являє собою джерело поживних органічних сполук. Ступінь ураження зерна мікроміцетами при зберіганні залежить від умов навколишнього середовища (температури, вологості, концентрації кисню і вуглекислого газу) [1,2].

Усі токсичні гриби здатні викликати патологічний процес в організмі тварин. Вони обумовлюють аліментарні гострі і хронічні токсикози, респіраторні токсикози, алергії, дизбактеріози, дистрофію печінки, особливо у птиці.

Ураження кормів мікроміцетами та забруднення їх мікотоксинами завдає значних економічних збитків, які включають прямі втрати кормів, зниження їх поживної та кормової цінності, а також захворювання і загибель тварин, підвищення чутливості їх до інфекційних захворювань, витрати на проведення мікотоксикологічних досліджень та детоксикацію забруднених кормів [3].

На думку більшості вчених безпечних доз мікотоксинів не існує, а повністю уникнути контамінації кормів токсичними грибами практично не можливо. Насьогодні найбільш оптимальними методами детоксикації мікотоксинів для кормів у тваринництві та птахівництві вважається використання ентеросорбентів. Сорбенти знижують біологічну активність мікотоксинів, зменшують всмоктування токсинів у шлунково-кишковому тракті, захищають продукцію тваринництва від забруднення мікотоксинами. Метод сорбції вважається найбільш ефективним і безпечним для тварин.

Ідеальний ентеросорбент повинен здійснювати такі функції: поглинання токсичних метаболітів, що утворюються безпосередньо в шлунково-кишковому тракті та токсинів, які потрапляють туди ззовні та із крові зворотним шляхом; зв'язування токсичних речовин, які виділяються разом із травними соками. Ентеросорбенти повинні: бути також нетоксичними; не травматичними для слизових

оболонки; добре евакуюватися із кишковика; мати високу сорбційну ємкість по відношенню до видалюваних компонентів; приводити до мінімальних втрат корисних речовин; зв'язані компоненти не повинні піддаватися десорбції, змінювати рН середовища, впливати на процеси секреції та біоценоз мікрофлори кишковика [4].

Лікувальний ефект сорбенту досягається за рахунок фізико-хімічних властивостей сорбуючої речовини, яка здатна зв'язувати та виводити з організму токсичні продукти. Не дивлячись на те, що в природі не існує «ідеального» сорбенту, цей напрям є найбільш перспективним, а метод сорбції є найбільш ефективним і безпечним для тварин [5,6].

Метою даної роботи було вивчення сорбційної ефективності препаратів *in vitro*, відносно чотирьох культур грибів-продуцентів мікотоксинів: стеригматоцистину, патуліну, афлатоксину В1 та Т-2 токсину.

Матеріали і методи. В роботі використано активні штами грибів-продуцентів мікотоксинів культивовані в лабораторії мікотоксикології ІВМ: *Aspergillus nidulans* (продуцент стеригматоцистину), *Penicillium urticae* (продуцент патуліну), *Aspergillus flavus* (продуцент афлатоксину В1), *Fusarium sporotrichioides var. poae* (продуцент Т-2 токсину), а також 18 сорбентів вітчизняних та іноземних виробників: «Чек-о-токс», Індія, «Клінофід», Великобританія; «Екосорб», Естонія; «Baracid», Польща; «Toxidex-premix», Іспанія; «Салкіл», Великобританія; «Мікотокс NG», Франція; «Мікофікс», Австрія; «Зеніфікс», Аргентина; «Фрітокс», Нідерланди; «Біо-токс», Німеччина; «Сорботокс», Великобританія; «Бакт-ацид», Великобританія; «Альфасорб», Україна; «Кормосан» Україна; «Активоване вугілля», Україна; «Міколад», Україна; «Вітакорм-Рео», Україна.

Під час дослідження, за кількість досліджуваного сорбенту брали рекомендовану виробником дозу, а також дозу, збільшену вдвічі для порівняльної дії. Посіви інкубували при температурі 24-27 °С упродовж 14 діб, а штам *Fusarium sporotrichioides var. poae* додатково інкубували в холодильнику при температурі +4 °С протягом 14 діб, після чого, отримані культури перевіряли на здатність до токсиноутворення.

Кількість мікотоксину в культурі гриба дорівнювала максимально допустимому рівню, окрім Т-2 токсину, кількість якого перевищувала МДР в 4 рази.

До культуральної рідини активного штаму гриба-продуцента додавали окремо досліджуваний сорбент в кількості 200 мг (рекомендована доза виробником) та 400 мг, перемішували і залишали на 30 хв.

Дослідження на наявність мікотоксинів проводили методом тонкошарової хроматографії згідно «Скринінг-методу одночасного виявлення афлатоксину В₁, патуліну, стеригматоцистину, Т-2 токсину, зеараленону та дезоксиніваленолу» [7]. Екстракт наносили на пластину «Силуфол», «Силуфол УФ-254» хроматографували в системі розчинників толуол-етилацетат-мурашина кислота (5:4:1) та продивлялись в УФ-променях з довжиною хвилі 365 нм. Для виявлення афлатоксину В1 пластину продивлялися в УФ-променях із довжиною хвилі 254 і 365 нм. При наявності в екстракті афлатоксину В1, виявляли пляму синього кольору на фоні флуоресцюючої пластини з R_f, яке дорівнює R_f стандарту афлатоксину В1 (0,36). Для виявлення стеригматоцистину пластину обробляли 20% спиртовим розчином алюмінію хлористого з послідовним нагріванням при температурі 80 °С протягом 5 хв та продивлялися в УФ-променях із довжиною хвилі 365 нм. При наявності стеригматоцистину відмічали на пластинці плями зелено-жовтого кольору з R_f,

яке дорівнює R_f стандарту стеригматоцистину (0,78). Наявність Т-2 токсину встановлювали після обробки пластин 20%-ним спиртовим розчином сірчаної кислоти та термічної обробки при температурі 130 °С протягом 1-3 хв. Для виявлення патуліну пластину “Силуфол УФ-254” поміщали на 15-20 хв. в камеру з хлором, просушували у витяжній шафі і обробляли 0,5% розчином гідрохлориду бензидину та продилялися в УФ-променях з довжиною хвилі 254 та 365 нм.

Результати досліджень. Визначення сорбційної активності відносно культури грибів-продуцентів мікотоксинів проводилось на 18 сорбентних препаратах іноземного та вітчизняного виробництва, що використовуються в тваринницьких та птахівничих господарствах для профілактики мікотоксикозів. Детоксикаційна дія всіх препаратів вивчалась відносно штамів культури грибів – *Aspergillus nidulans* – продуцента стеригма-тоцистину, *Penicillium urticae* – продуцента патуліну, *Aspergillus flavus* – продуцента афлатоксину В1 та *Fusarium sporotrichioides var. poae* - продуцента Т-2 токсину.

В результаті досліджень було встановлено, що найкращу сорбуючу активність відносно культури гриба *Aspergillus nidulans* – продуцента стеригматоцистину проявили такі препарати: “Фрітокс” 98%; “Чек-о-токс” – 98%; “Альфасорб” – 98%; “Varacid” – 75%; “Toxidex-premix” – 75%; “Салкіл” – 75%; “Вітакорм-Рео”, “Міколад”, “Кормосан”, “Клінофід”, “Екосорб” та “Мікотокс” – 50%. Решта препаратів показала здатність до сорбції - нижче за 50%. Результати досліджень відносно культури гриба *Aspergillus nidulans* приведені на рисунку 1.

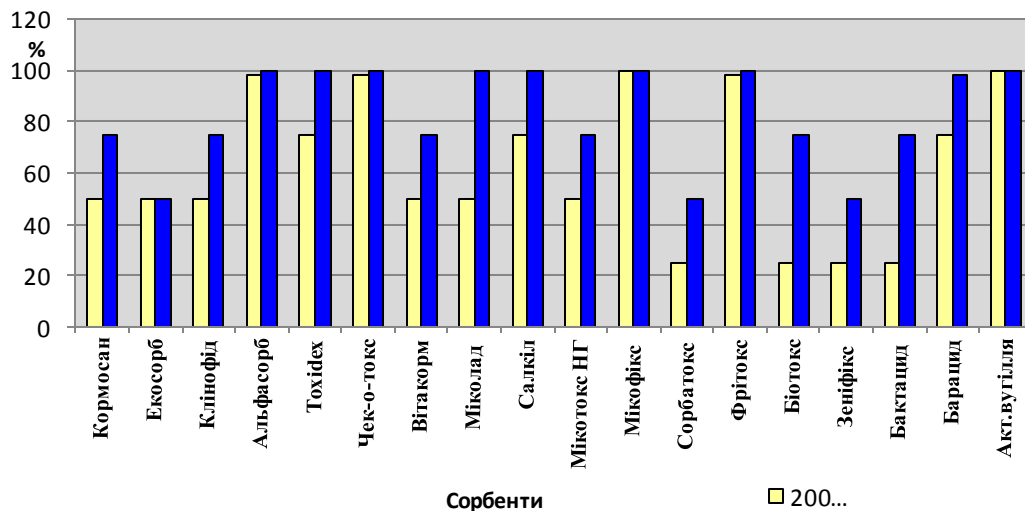


Рис. 1. Сорбуюча активність препаратів відносно культури гриба-продуцента стеригматоцистину – *Aspergillus nidulans*, %

Характерно, що препарати “Активоване вугілля” та “Мікофікс”, що проявили 100% сорбції, а також “Фрі-токс”, “Чек-о-токс”, “Альфасорб” (98% сорбції), в своєму складі містять переважно алюмосилікати та природні харчові волокна.

Збільшення рекомендованої виробником дози вдвічі підвищило сорбуючу активність тих препаратів, що раніше проявили незначну активність сорбції. Наприклад, “Varacid” збільшив показники до 98%, “Toxidex-premix” – до 100%, “Біотокс” – до 75%, “Салкіл” – до 100%, “Бакт-а-цид” – до 75%, “Міколад” – до 100%.

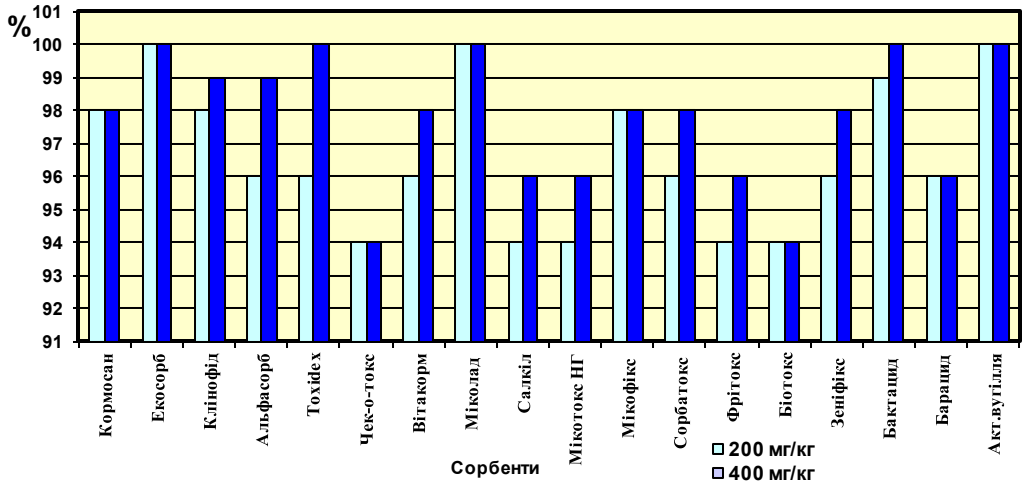


Рис.2. Сорбуюча активність препаратів відносно культури гриба-продуцента патуліну *Penicillium urticae*, %

При дослідженні сорбуючої активності (рис.2) відносно культури гриба *Penicillium urticae* – продуцента патуліну, 100% сорбцію проявили – “Екосорб”, “Активоване вугілля” та “Міколад”; “Бакт-а-цид” – 99%; “Клінофід” – 98%, “Кормосан” та “Мікофікс” – 98%; “Вітакорм-Рео”, “Toxidex-premix”, “Альфа-сорб”, “Baracid”, Сорбатокс” та “Зеніфікс” – 96%; сорбували мікотоксини на 94% – “Чек-о-токс”, “Салкіл”, “Біо-токс”, “Фрі-токс” та “Мікотокс”.

Отже, досить високу сорбуючу активність показали більшість досліджуваних препаратів навіть у дозі 200 мг/кг. Активними по відношенню до патуліну виявилися препарати вітчизняних виробників, такі як: “Активоване вугілля” та “Міколад”, “Вітакорм-Рео”, “Кормосан” та “Альфасорб”. Більшість з них містять в своєму складі стінки дріжджових клітин (Міколад, Кормосан), активоване вугілля та природні харчові волокна (Вітакорм-Рео, Альфасорб). Сорбуюча активність збільшеної вдвічі дози, як показує рисунок 2, змінилась лише у деяких препаратів.

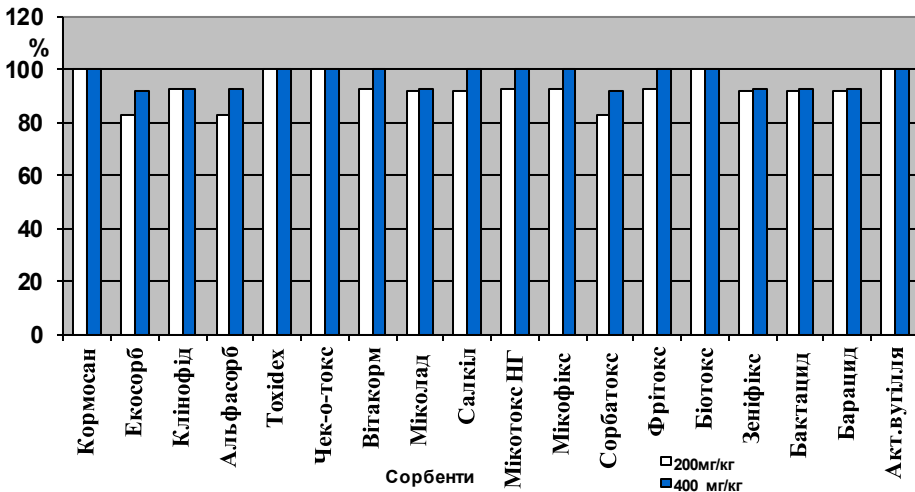


Рис.3. Сорбуюча активність препаратів відносно культури гриба-продуцента афлатоксину В1 *Aspergillus flavus*, %

Сорбуюча активність в досліджуваних зразках відносно культури гриба *Aspergillus flavus* - продуцента афлатоксину В1 була досить високою (рис.3). 100% сорбція спостерігалась у препаратів: “Чек-о-токс”, “Toxidex-premix”, “Кормосан”, “Біо-токс”, “Активоване вугілля”; 92-93% - у ”Вітакорм-Рео“, “Міколада”, “Клінофіда”, “Varacid”, “Салкіла”, “Бакт-а-цида”, “Мікотокса”, “Зеніфікса” та “Мікофікса”; 83% - у “Альфасорба”, “Екосорба” та “Сорбатокса”. Після збільшення досліджуваної дози, до 100% підвищились показники у препаратів “Вітакорм-Рео”, “Фрі-токс”, “Мікотокс” та ”Мікофікс”.

Згідно літературних даних, які підтверджуються власними дослідженнями, сорбенти, особливо ті, що містять в своєму складі алюмосилікати, досить активно сорбують афлатоксин В1, який відноситься до полярних мікотоксинів. При збільшенні дози вдвічі (400 мг/кг) активність сорбції була такою ж високою, як і при використанні рекомендованої дози.

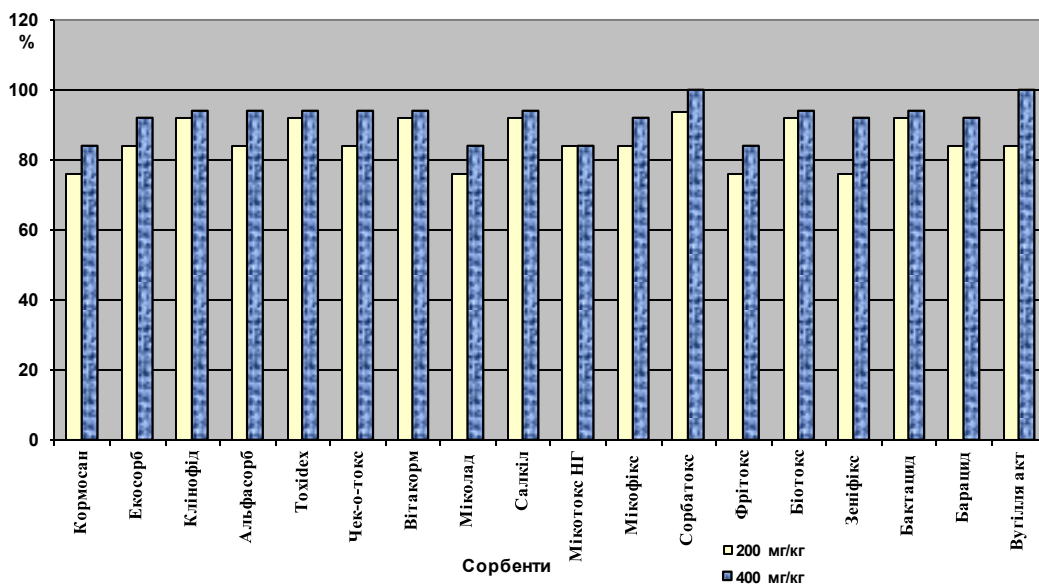


Рис.4. Сорбуюча активність препаратів відносно культури гриба-продуцента Т-2 токсину *Fusarium sporotrichiella var. poae*, %

Сорбція відносно Т-2 токсину (продуцент – *Fusarium sporotrichioides var. poae*) була не достатньо активною (рис.4). Це пов’язано з тим, що трихотеценові мікотоксини належать до неполярної групи і тому піддаються сорбції гірше ніж полярна група. На 92% сорбція проходила у препаратів: ”Вітакорм-Рео“, “Біо-токс”, “Салкіл” та “Бакт-а-цид”. На 84% сорбція відбулась у “Альфасорба”, “Чек-о-токса”, “Varacid”, “Екосорба”, “Активованого вугілля”, “Мікотокса” та “Мікофікса”. Решта мала відсоток сорбції, що склав 76 %.

У частині досліджу, де доза була збільшена вдвічі, деякі препарати проявили кращу сорбуючу активність, ніж при рекомендованій дозі. Наприклад, “Активоване вугілля” та “Сорбатокс” показали 100 % сорбцію при дозі 400 мг/кг, решта препаратів з відсотковою дією 92% мали збільшений відсоток сорбуючої активності (Varacid, Екосорб, Мікофікс, Зеніфікс), інші незначно підвищили свою дію – з 92 до 94 % (Вітакорм-Рео, Бакт-а-цид, Салкіл, Біо-токс, Клінофід, Toxidex-

premix). Отже для даних препаратів збільшення дози не обов'язкове, оскільки їх сорбуюча активність достатня при дозі, рекомендованій виробником.

Отже, аналіз наведених даних відносно детоксикаційної дії сорбентних препаратів відносно культури грибів-продуцентів мікотоксинів показує, що їх використання є на сьогодні одним із кращих методів для профілактики та лікування мікотоксикозів тварин.

В даний час ринок сорбентних препаратів в більшості представлений продуктами іноземних виробників і лише невисоким відсотком вітчизняних. Більшість іноземних препаратів характеризуються активною сорбційною дією, але мають в порівнянні з вітчизняними високу вартість. Тому на сьогодні актуальним залишається питання використання препаратів вітчизняного виробництва, які б не поступалися б іноземним ні за якістю ні за ціною.

Отримані в цілому позитивні результати досліджень показали, що деякі препарати при рекомендованій дозі не проявили бажаної активності сорбції. З цією метою рекомендована виробником доза препаратів була збільшена у два рази. Аналіз ефективності рекомендованої та збільшеної вдвічі дози показав, що високий відсоток сорбції був виявлений лише відносно окремих штамів грибів-продуцентів мікотоксинів.

Збільшена вдвічі рекомендована виробником доза підвищила сорбуючу активність препаратів лише до стеригматоцистину, та в деякій мірі до афлатоксину В1. Результат не змінився відносно патуліну, та лише дещо підвищився відносно Т-2 токсину, інші препарати свою активність до збільшеної вдвічі дози підвищили несуттєво.

Головним чинником в підвищенні активності сорбції на нашу думку є особливості структури, як мікотоксинів так і сорбентів. Активність сорбуючої дії також залежить і від властивостей тих чи інших токсинів. Наприклад, відомо, що полярні мікотоксини сорбуються значно краще неполярних.

Як показують літературні дані та наші дослідження, високому відсотку сорбції афлатоксин В1 в порівнянні з Т-2 токсином зобов'язаний структурі своєї будови, пов'язаної з полярністю самого токсину. Т-2 токсин, що належить до групи неполярних трихотеценових мікотоксинів піддається сорбції значно гірше, що треба завжди враховувати при підборі сорбентних препаратів.

Висновки. 1. Використання сорбентних препаратів на сьогодні є одним із ефективних підходів щодо вирішення проблеми мікотоксикозів тварин та птиці.

2. Рівень сорбуючої дії препарату залежить від складу сорбенту та полярності мікотоксинів. 3. Здатність препаратів до активної сорбції безпосередньо з культурою гриба (умови наближені до природних) свідчить про перспективу їх застосування у виробництві з метою збереження поголів'я, підвищення середньодобового приросту, продуктивності та зменшення витрат на лікування.

1. *Жданова Н. М.* Моніторинг мікроміцетів при визначенні екологічного стану ґрунтів / Н.М. Жданова. // Агроекологічний моніторинг та паспортизація с.-г. земель. – К., 2002. – С. 146-152.

2. *Петенко А. И.* Обеспечение биологической безопасности кормов/ А. И. Петенко, В. А. Ярошенко, А. Г. Кошаев, А. К. Карганян // Ветеринария. – 2006.- №7 – С.7-11.

3. Таланов Г. А. Современные проблемы ветеринарной токсикологии / Г. А. Таланов // М., 1999. – Т.2. – С.77-79.

4. Dale N., Mycotoxin binders: Its time for real science. Poultry Digest. 57, 1998. - P.38-39.

5. Diaz D. E., Smith, T. K. Mycotoxin sequestering agents: practical tools for the neutralisation of mycotoxins. In: Diaz D. E. (Ed.), The Mycotoxin Blue Book, vol. 1. Nottingham University Press, Nottingham, 2005. - P. 323–339.

6. Ramos, A. J., Fink-Gremmels, J., Hernandez, E. Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of nonnutritive adsorbent compounds. Journal of Food Protection, 59.-1996.- 631-641.

7. Скринінг-метод одночасного виявлення афлатоксину В₁, патуліну, стеригматоцистину, Т-2 токсину, зеараленону та вомітоксину в різних кормах. – Затв. Держдепартам. вет. мед. Мін. АПК України 09.04.1996р.

ИЗУЧЕНИЕ ДЕТОКСИКАЦИОННОГО ДЕЙСТВИЯ СОРБЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ IN VITRO ОТНОСИТЕЛЬНО КУЛЬТУРЫ ГРИБОВ-ПРОДУЦЕНТОВ МИКОТОКСИНОВ / М. Е. Рудая, О. Н. Васянович

В статье представлены результаты исследований in vitro 18 сорбентов относительно активных штаммов грибов-продуцентов Aspergillus nidulans, Aspergillus flavus, Penicillium urticae, Fusarium sporotrichioides var. poae. Установлен уровень детоксикации наиболее эффективных зарубежных и отечественных сорбентов.

Ключевые слова: микотоксины, грибы-продуценты, сорбенты, стеригматоцистин, афлатоксин В₁, патулин, Т-2 токсин.

STUDY OF THE IN VITRO SORBENTS DETOXIFICATION ACTION IN RESPECT OF FUNGI – PRODUCERS OF MYCOTOXINS / М. Е. Ruda, О. N. Vasyanovich

The article outlines the results of research of in vitro 18 sorbents in respect of active strains of fungi- producers Aspergillus nidulans, Aspergillus flavus, Penicillium urticae, Fusarium sporotrichioides var. poae. The degree of detoxification of the most effective foreign and domestic sorbents was defined.

Key words: mycotoxins, fungus, sorbents, sterymatocystyn, aflatoxin B₁, patulin, T-2 toxin.

Рецензент – кандидат ветеринарных наук **В. П. Сапейко**