АДСОРБЕНТ МИКОТОКСИНОВ: ИССЛЕДОВАНИЯ *IN VITRO* И *IN VIVO*

ДЖ. РАЙ, **Х. ФАРКАШ**, **Я. БОШНЯК-НОЙМЮЛЛЕР**, **М. ВАСИЛЬЕВИЧ**, PATENT Co., Сербия

Микотоксины

Широкое использование сырья при производстве кормов для животных связано с потенциальным риском заражения продукции животноводства различными химическими и микробиологическими загрязнителями. Корма могут быть контаминированы микроорганизмами, микотоксинами, отходами жизнедеятельности животных, другими органическими загрязнителями, токсичными металлами. Контаминация микотоксинами в настоящее время признана одной из глобальных проблем в сельскохозяйственном производстве, особенно в животноводстве. Микотоксины представляют собой вторичные метаболиты, продуцируемые плесневыми грибами под действием ряда стресс-факторов (высокие или низкие температуры, засуха, большие атмосферные осадки, наводнения, условия при сборе урожая и др.). Один вид плесневых грибов может вырабатывать несколько микотоксинов, при этом один и тот же токсин может вырабатываться разными видами плесеней. По оценке Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), около четверти всех производимых в мире пищевых продуктов заражены в пищевой цепочке хотя бы одним микотоксином. Сегодня известно более 300 микотоксинов, но лишь несколько из них могут заражать корма для животных. Важнейшими из них являются афлатоксины, продуцируемые грибами рода *Aspergillus*, охратоксин — метаболит гриба рода *Penicillium*, а также фумонизин, зеараленон и дезоксиниваленол, которые вырабатываются грибами рода *Fusarium*.

В настоящей работе мы провели анализ *in vitro* и *in vivo* эффективности использования адсорбента **MINAZEL PLUS** (Миназель Плюс) против микотоксинов.

Анализ на содержание микотоксинов

Чтобы проверить, заражены ли микотоксинами корма, анализируют их компоненты и другие продукты на содержание этих токсинов. Результаты анализа в высокой степени зависят от правильности методики отбора проб, поскольку микотоксины могут быть неравномерно распределены в массе зерна и других продуктах. Для обнаружения микотоксинов применяют целый ряд методов, среди которых иммуноферментный анализ (ИФА), тонкослойная хроматография (ТСХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газовая хроматография (ГХ). В большинстве этих методов для предотвращения взаимодействия между микотоксинами и повышения точности измерения их концентраций используются твердофазное колоночное разделение экстрактов образцов и иммуноафинные методы. Для быстрого ориентировочного анализа лучше всего подходит метод ИФА, однако для полного подтверждения его результатов требуется дополнительный анализ с помощью жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. Последний является наиболее чувствительным и предпочтительным методом анализа содержания микотоксинов в кормах и продуктах питания. Поскольку в компании PATENT часто проводятся анализы кормов для животных на содержание микотоксинов, мы используем для этого быстрый и простой метод ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (УВЭЖХ-ТМС), позволяющий идентифицировать и точно определять концентрации всех основных микотоксинов (афлатоксины B1, B2, G1 и G2, дезоксиниваленол (ДОН), зеараленон, фумонизины B1 и B2, T2 и HT-2 токсины, охратоксин), содержание которых в кормах регулируется в странах ЕС (директивы Евросоюза: 2002/32/EC; 2006/576/EC и 2013/165/EU). Метод основывается на предварительной подготовке проб, которая состоит из экстракции образцов и центрифугирования экстракта. Для компенсации матричного эффекта при электрораспылительной ионизации в экстракты перед впрыскиванием в анализатор добавляют ^{13}C-меченые внутренние стандарты для каждой группы микотоксинов — помечают афлатоксин B1, ДОН, зеараленон, охратоксин, фумонизин B1 и T2 токсин (рис. 1). Данный метод с успехом применяется для анализа на микотоксины образцов кукурузы, пшеницы, ячменя, соевого шрота, пшеничных отрубей, подсолнечного жмыха, комбикормов, полнорационных кормовых смесей для жвачных. Показатели точности этого метода были оценены внутрилабораторными тестами. В «пустые» образцы вводили смесь 11 микотоксинов в двух уровнях концентрации (предел количественного определения и тот же предел, увеличенный десятикратно). Относительное стандартное отклонение воспроизводимости метода по всем анализируемым веществам находится в пределах от 2,5 до 13,4%, кажущийся выход — в пределах от 62 до 115%.

Тестирование адсорбента MINAZEL PLUS *in vitro* методом адсорбции/десорбции

MINAZEL PLUS — это результат поверхностной модификации клиноптилолита органическими катионами,

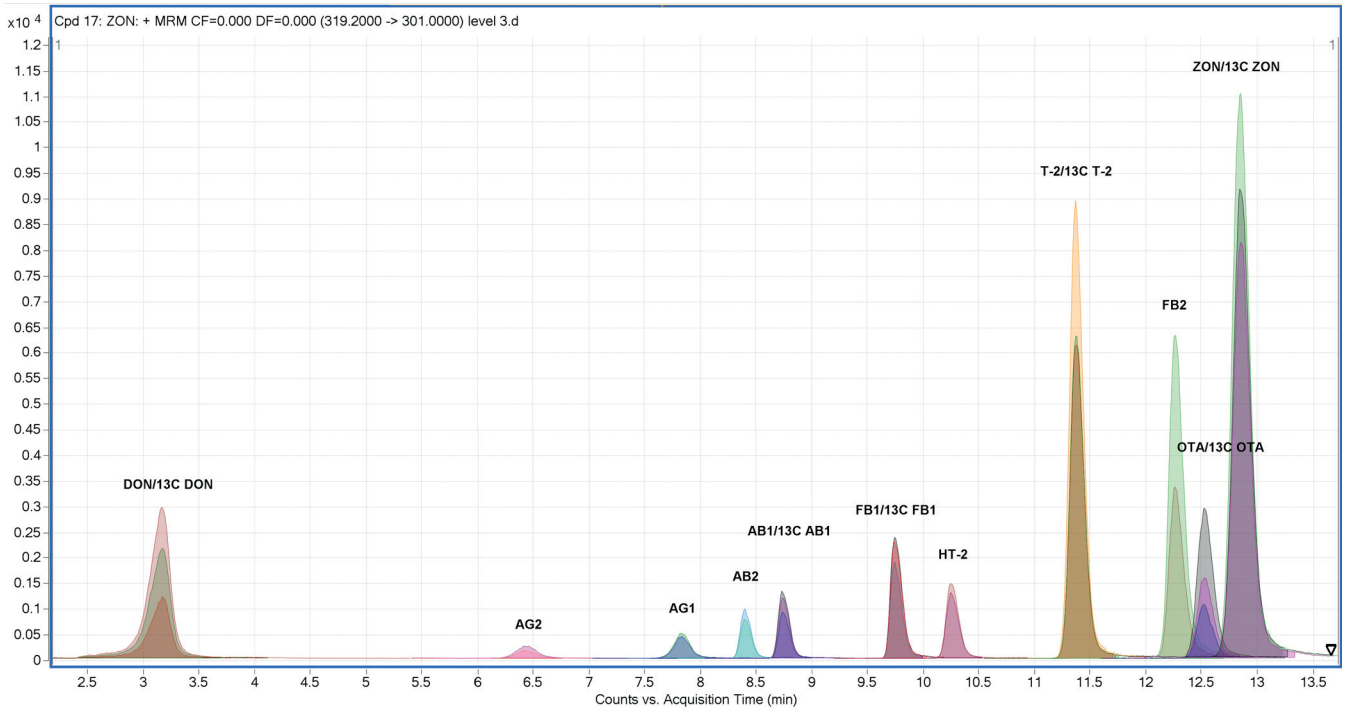

Рис. 1. Хроматограмма внутренних стандартов 11 микотоксинов, регулируемых в Евросоюзе, в калибровочном образце и их аналогов, меченых изотопом ^{13}C (Farkas и соавт., Toxins 2017, 9, 276: 76.)

которая позволяет получить высокую степень адсорбции полярных и менее полярных молекул микотоксинов. К поверхности минерала плотно прикреплены длинноцепочечные органические катионы, которые создают новые активные центры, способные эффективно связывать менее полярные молекулы микотоксинов. В компании PATENT в качестве стандартного метода оценки адсорбционной способности адсорбентов принят метод адсорбции/десорбции. После адсорбции препаратом MINAZEL PLUS молекулы микотоксинов уже не высвобождаются в кишечном тракте животных. Анализы, выполненные в нашей лаборатории с помощью метода УВЭЖХ-ТМС, показали, что данный препарат может адсорбировать более 80% всех важнейших микотоксинов с очень низким уровнем последующей десорбции. Так, в опытах *in vitro* MINAZEL PLUS адсорбировал 100% афлатоксина B1, 88% зеараленона, 91% охратоксина и 98% фумонизина B1; уровни десорбции составили: 0; 2,3; 1,0 и 3,9% соответственно (рис. 2).

Скорость адсорбции

Микотоксины попадают в организм животных в основном с кормом, в конечном итоге они попадают в кровоток, распределяются по всему организму и оказывают на него токсическое действие. Примерно через 30 мин после потребления корма микотоксины обнаруживаются в крови, а через 60 мин их можно обнаружить в печени.

Препарат MINAZEL PLUS высокоэффективен в широком спектре pH: он надежно связывает микотоксины при низких значениях pH желудка и не десорбирует их в нейтральной среде кишечника. Препарат может адсорбировать более 78%

Рис. 2. Эффективность MINAZEL PLUS в опытах in vitro

афлатоксина B1, фумонизина B1, зеараленона и охратоксина в течение пяти минут контакта с микотоксинами (рис. 3).

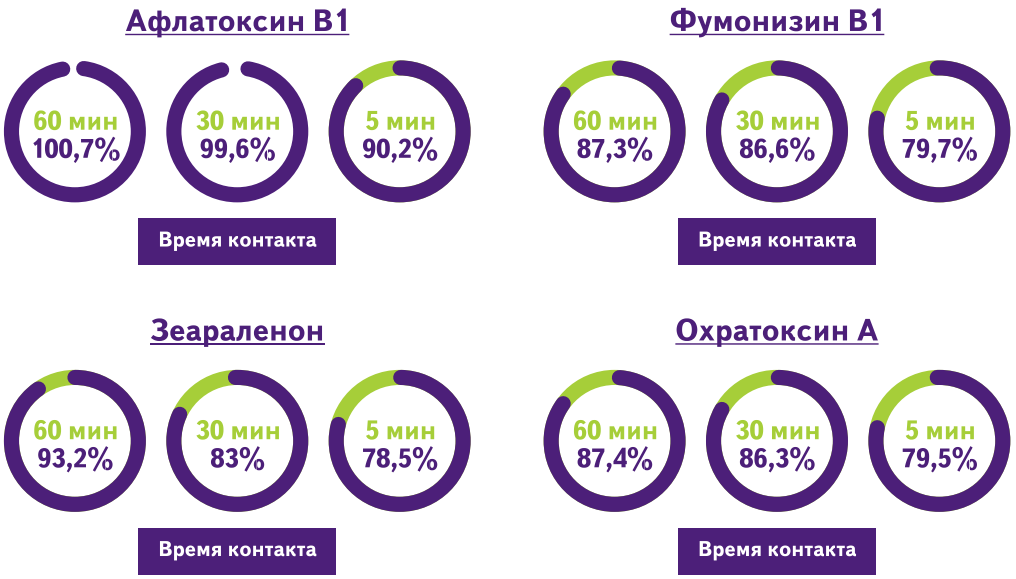

Рис. 3. MINAZEL PLUS: скорость адсорбции микотоксинов (метод УВЭЖХ-ТМС)

Тестирование адсорбента MINAZEL PLUS *in vivo*

Целью исследования *in vivo* было изучение эффективности адсорбента микотоксинов MINAZEL PLUS в предотвращении токсических эффектов охратоксина у кур-несушек. В опыте использовали 48 голов птицы с 27-недельного возраста. Ее разделили на 6 групп по 8 голов в каждой и кормили в течение 7 недель стандартным рационом для несушек с добавлением охратоксина и адсорбента MINAZEL PLUS по схеме, представленной в таблице 1.

Отслеживали влияние охратоксина на продуктивность кур (живая масса, потребление корма, яйценоскость, масса яиц). В группах, получавших охратоксин с добавкой 0,2% адсорбента, показатели продуктивности были выше, чем в группах, получавших охратоксин без адсорбента. Интересно отметить, что добавление в стандартный рацион MINAZEL PLUS (5 группа) привело к повышению живой массы несушек, яйценоскости, а также к улучшению конверсии корма по отношению к контрольной группе.

Таблица 1. Схема опыта

Группа	Особенности кормления
Контрольная	Стандартный рацион (СР)
1 опытная	СР + 1 мг/кг охратоксина
2 опытная	СР + 0,25 мг/кг охратоксина
3 опытная	СР+0,25 мг/кг охратоксина+0,2% MINAZEL PLUS
4 опытная	СР +1 мг/кг охратоксина + 0,2% MINAZEL PLUS
5 опытная	СР + 0,2% MINAZEL PLUS

Начиная со 2-й недели опыта, несушки 1 опытной группы по живой массе уступали остальным пяти группам (табл. 2). В 5 опытной группе, птица которой дополнительно получала только адсорбент (без микотоксина), живая масса превышала таковую в 1, 2, 3 и 4 опытных группах. Эти данные согласуются с ранее полученными Duarte и соавт. (2011); Denli и соавт. (2008).

Потребление корма было достоверно самым низким в 1 опытной группе — корм с самой высокой дозой охратоксина, без адсорбента (табл. 3) . Кроме того, во 2 опытной группе, где использовалась наименьшая доза охратоксина (без адсорбента), живая масса в некоторые недели была ниже, чем в 3, 4, 5 опытных группах и в кон-

Таблица 2. Живая масса кур-несушек в группах, г

Группа	Дни опыта			
	1-й	14-й	28-й	49-й
Контрольная	15 025 ± 40,34	15 055 ± 47,97	15 260 ± 35,30	15 565 ± 36,10
1 опытная	15 020 ± 52,07	13 565 ± 62,06	13190 ± 62,85[aa]	11 320 ± 64,04[aaa]
2 опытная	14 968 ± 34,20	13 905 ± 41,62	14 150 ± 54,17	14 435 ± 29,07a
3 опытная	14 805 ± 76,95	14 550 ± 67,68	14 770 ± 35,98	13 665 ± 34,05[aaa]
4 опытная	14 865 ± 59,49	15 005 ± 44,70	15 155 ± 34,76[bb]	15 340 ± 50,56 [bbb;d]
5 опытная	14 970 ± 38,32	15 350 ± 29,27[b]	15 840 ± 49,90[bbb,c]	15 975 ± 42,70 [bbb,dd]

a — статистически достоверная разница с контрольной группой (a = P < 0,05 aa = P < 0,01 aaa = P < 0,001)
b — статистически достоверная разница с группой 1 (b = P < 0,05; bb = P < 0,01; bbb = P < 0,001)
c — статистически достоверная разница с группой 2 (c = P < 0,05; cc = P < 0,01; ccc = P < 0,001)
d — статистически достоверная разница с группой 3 (d = P < 0,05; dd = P < 0,01; ddd = P < 0,001)
e — статистически достоверная разница с группой 4 (e = P < 0,05; ee = P < 0,01; eee = P < 0,001)
f — статистически достоверная разница с группой 5 (f = P < 0,05; ff = P < 0,01; fff = P < 0,001).

Таблица 3. Потребление корма, г

Группа	Недели опыта						
	1	2	3	4	5	6	7
Контрольная группа							
	951,4 ± 0,69^{bbb,ccc}	949,3 ± 6,07^{bbb}	955,0 ± 7,07^{bbb}	957,9 ± 5,66^{bbb}	958,6 ± 2,44^{bbb,ccc}	956,4 ± 2,44^{bbb,ddd}	957,9 ± 2,67^{bbb}
Опытные группы							
1	655 ± 5,31	675 ± 72,17	724,3 ± 59,3	794,3 ± 73,0	841,7 ± 69,51	879,3 ± 15,12	815,0 ± 53,62
2	913,6 ± 14,06^{bbb}	921,4 ± 24,62^{bbb}	946,4 ± 6,26^{bbb}	944,3 ± 5,34^{bbb}	943,6 ± 14,35^{bbb,}	938,6 ± 28,97^{bbb}	951,4 ± 5,56^{bbb}
3	932,1 ± 9,51^{bbb}	950,7 ± 3,45^{bbb}	951,4 ± 6,90^{bbb}	895,7 ± 109,4^{b}	868,6 ± 56,91^{cc}	898,6 ± 31,19^{cc}	925,0 ± 22,73^{bbb}
4	945,7 ± 4,49^{bbb,cc}	950,7 ± 5,34^{bbb}	952,1 ± 4,88^{bbb}	944,3 ± 14,56^{bbb}	954,3 ± 4,49^{bbb,dd}	944,3 ± 17,18^{bbb,ddd}	952,1 ± 10,75^{bbb}
5	951,4 ± 7,48^{bbb,ccc}	954,3 ± 5,34^{bbb}	956,4 ± 3,78^{bbb}	960,0 ± 0,0^{bbb}	959,3 ± 1,89^{bbb,ccc}	956,4 ± 4,75^{bbb,cc}	958,6 ± 2,44^{bbb}

a — статистически достоверная разница с контрольной группой (a = P < 0,05 aa = P < 0,01 aaa = P < 0,001)
b — статистически достоверная разница с группой 1 (b = P < 0,05; bb = P < 0,01; bbb = P < 0,001)
c — статистически достоверная разница с группой 2 (c = P < 0,05; cc = P < 0,01; ccc = P < 0,001)
d — статистически достоверная разница с группой 3 (d = P < 0,05; dd = P < 0,01; ddd = P < 0,001)
e — статистически достоверная разница с группой 4 (e = P < 0,05; ee = P < 0,01; eee = P < 0,001)
f — статистически достоверная разница с группой 5 (f = P < 0,05; ff = P < 0,01; fff = P < 0,001).

Таблица 4. Число снесенных яиц, шт.

Группа	Недели опыта						
	1	2	3	4	5	6	7
Контрольная	51 ± 0,3	52 ± 0,20^{bbb}	55 ± 0,14^{bbb}	56 ± 0,0^{bb}	55 ± 0,14^{b}	54 ± 0,48^{bb}	50 ± 0,14^{bbb}
1 опытная	52 ± 0,14	40 ± 0,42	39,0 ± 0,20	47 ± 1,38	46 ± 0,53	45 ± 0,97	38 ± 0,53
2 опытная	52 ± 0,37	53 ± 0,53^{bbb}	55,0 ± 0,14^{bbb}	55 ± 0,38^{b}	55 ± 0,14^{b}	54 ± 70,48^{bb}	54 ± 0,18^{bbb}
3 опытная	54 ± 0,28	54 ± 0,48^{bbb}	55,0 ± 0,14^{bbb}	53 ± 0,53	53 ± 0,3^{b}	53 ± 0,78^{bb}	53 ± 0,20^{bbb}
4 опытная	54 ± 0,18	55 ± 0,38^{bbb}	54 ± 0,18^{bbb}	54 ± 0,48	55 ± 0,14^{b}	56 ± 0,0^{bbb}	53 ± 0,3^{bbb}
5 опытная	52 ± 0,0	56 ± 0,0^{bbb}	56, ± 0,0^{bbb}	56 ± 0,0^{bb}	56 ± 0,0^{bbb}	56 ± 0,0^{bbb}	56 ± 0,0^{bbb,a}

a — статистически достоверная разница с контрольной группой (a = P < 0,05 aa = P < 0,01 aaa = P < 0,001)
b — статистически достоверная разница с группой 1 (b = P < 0,05; bb = P < 0,01; bbb = P < 0,001)
c — статистически достоверная разница с группой 2 (c = P < 0,05; cc = P < 0,01; ccc = P < 0,001)
d — статистически достоверная разница с группой 3 (d = P < 0,05; dd = P < 0,01; ddd = P < 0,001)
e — статистически достоверная разница с группой 4 (e = P < 0,05; ee = P < 0,01; eee = P < 0,001)
f — статистически достоверная разница с группой 5 (f = P < 0,05; ff = P < 0,01; fff = P < 0,001).

трольной. Эти данные также согласуются с данными, ранее полученными Duarte и соавт. (2011) и Denli и соавт. (2008).

Яйценоскость в 1 опытной группе за 2-ю и 3-ю недели опыта была достоверно ниже, чем в остальных группах, причем эта тенденция сохранялась на всем протяжении опыта (табл. 4). Интересно отметить, что 4 группа (1 мг/кг охратоксина и 0,2% MINAZEL PLUS) по этому показателю превосходила 1 опытную группу. Данный факт свидетельствует о защитном эффекте изучаемого адсорбента микотоксинов против охратоксина в рационе несушек. Наибольший показатель по яйценоскости отмечался в 5 группе, получавшей только адсорбент. Эти данные также согласуются с данными, ранее полученными Duarte и соавт. (2011) и Denli и соавт. (2008).

В нашем опыте охратоксин в обеих изученных концентрациях оказывал негативное влияние на живую массу несушек и потребление ими корма. Добавление 0,2% MINAZEL PLUS в рационы с охратоксином или без него улучшало все продуктивные показатели. Потребление корма в группах, получавших корм с микотоксином, было ниже, чем в группах, получавших корм без него. Ввод адсорбента в корм с охратоксином оказывал защитный эффект против вредных воздействий изучаемого микотоксина на физиологию организма несушек, что отразилось, прежде всего, на яйценоскости.

Результаты проведенного нами опыта свидетельствуют о том, что MINAZEL PLUS является мощным и эффективным адсорбентом, который может снижать негативное влияние микотоксинов на здоровье и показатели продуктивности животных и птицы. ■

Список литературы предоставляется по запросу