

Эффективность одновременного связывания нескольких микотоксинов различными адсорбентами

В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА *in vitro*

Ник АДАМС, глобальный директор Alltech по менеджменту микотоксинов:

Благодарим журнал «Животноводство России» за публикацию статьи о результатах исследований, проведенных в Университете Квинс в Белфасте (Северная Ирландия). Эти исследования были независимыми и не финансировались какой-либо коммерческой организацией. Компания Alltech предоставила образец — препарат Микосорб®. Его тестировали наравне с другими добавками.

Так как торговые названия всех адсорбентов заменили номерами, Микосорб® фигурирует как продукт №6. Мы полагаем, что после публикации результатов исследований другим производителям адсорбентов, предоставившим свои продукты, так же, как и нам, сообщили порядковый номер их препарата. Поэтому решение о раскрытии торговых названий остальных продуктов остается за соответствующими производителями.

Разнообразие микотоксинов

Микотоксины — токсичные низкомолекулярные соединения. Их продуцируют в качестве вторичных метаболитов плесневые грибы разных видов, принадлежащие главным образом к родам *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* и *Claviceps* (Kovac M. et al., 2018). При определенных условиях (благоприятные влажность и температура воздуха) эти грибы могут поражать кормовые культуры и развиваться на них, вырабатывая микотоксины (Manna M. et al., 2017). Особенности климата, ошибки во время уборки урожая, неправильная организация суш-

ки, обработки и хранения растительной массы — основные причины заражения сырья плесневыми грибами и последующей его контаминации микотоксинами (Milani J., 2013). Наиболее восприимчивы к плесневым грибам кормовые культуры, в частности злаковые растения, зерно которых используют в кормлении сельскохозяйственных животных и птицы.

Среди свыше 400 идентифицированных сегодня микотоксинов наиболее экономически значимыми с точки зрения своей распространенности и негативного влияния на здоровье и продуктивность животных считают афлатоксин В1, дезоксиниваленол (ДОН),

зеараленон, охратоксин А и фумонизин — В1 и Т-2/НТ-2 токсин (Pitt J., 2010; Eskola M. et al., 2019).

Установлено, что при поражении плесневыми грибами некоторые растения частично конъюгируют микотоксины. Конъюгированные формы микотоксинов принято считать «замаскированными» микотоксинами, так как их очень сложно обнаружить, применяя традиционные аналитические методы. Данные исследований свидетельствуют, что конъюгированные формы микотоксинов представляют потенциальную угрозу для здоровья конечного потребителя, поскольку могут преобразовываться в исходные формы в желудоч-

но-кишечном тракте (ЖКТ) человека и животных (Kovac M. et al., 2018).

Основные виды микотоксинов

Микотоксины ДОН, Т-2 токсин, зеараленон и фумонизин В1 продуцируют плесневые грибы рода *Fusarium*, включая *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. verticillioides* и *F. poae* (Eskola M. et al., 2019). Микотоксины ДОН и Т-2 — мощные ингибиторы синтеза белков. При попадании в организм поражают полость рта, органы пищеварения, а также вызывают иммунологические и гематологические нарушения (Sobrova P. et al., 2010; Li Y. et al., 2011).

Зеараленон — эстрогенный микотоксин, который отрицательно влияет на репродуктивную систему животных (Frizzell C. et al., 2011). Фумонизин В1 поражает кишечник, провоцирует развитие некроза печени, диарею, нефрит и служит причиной появления отеков (Henry M. et al., 2001).

Охратоксин А вырабатывают плесневые грибы рода *Aspergillus* (в частности, *A. ochraceus*) и *Penicillium* (*P. verrucosum*). Охратоксин А обладает выраженными нефро-, гепато- и генотоксичными свойствами. При попадании этого микотоксина в организм нарушаются углеводный обмен и свертываемость крови (Bui-Klimke T. et al., 2014).

Афлатоксин В1 — вторичный метаболит, который продуцируют грибы рода *Aspergillus* (*A. flavus* и *A. parasiticus*). На организм афлатоксин В1 оказывает терато-, канцеро- и мутагенное действие, причем главным органом-мишенью служит печень (Rushing B. et al., 2019).

Методы борьбы с микотоксинами и классификация адсорбентов

При скармливании сельскохозяйственным животным и птице кормов, загрязненных одновременно несколькими микотоксинами, фиксируют более сложный, аддитивный, либо синергический эффект, чем при скармливании кормов, загрязненных только одним микотоксином (Sobral M. et al., 2018). Выраженность симптомов отравления зависит от ряда факторов, в том числе от типа микотоксина, его концентрации в корме, продолжительности воздействия на организм, а также от вида, пола и возраста животного. Диагностировать

патологию достаточно сложно, поскольку клинические проявления при поражении организма микотоксинами характеризуются большим разнообразием (Shiefer H., 1990).

По оценкам экспертов, в странах Европейского союза распространенность микотоксинов, загрязняющих зерновые культуры, превышает 25% (Eskola M. et al., 2019). При этом многочисленные попытки разработать универсальные способы снижения концентрации микотоксинов в кормах, например, термическая обработка и облучение (Raters M. et al., 2008; Calado T. et al., 2014), озонирование и аммонирование (Gomaa M., 1997; Trombete F. et al., 2016), а также применение микроорганизмов и ферментов (Taheur F. et al., 2019; Lyagin I. et al., 2019) не снизили большой популярности в силу различных причин. Поэтому наиболее общепринятым и экономически обоснованным методом контроля качества корма, применяемым во всем мире, остается использование адсорбентов микотоксинов (De Mil T. et al., 2015). Адсорбенты включают в рационы для животных и птицы с целью предотвращения всасывания микотоксинов в кровь и их последующего систематического воздействия на организм и различные органы-мишени (Di Gregorio M. et al., 2014). Адсорбенты условно подразделяют на две группы — собственно адсорбенты (эти препараты связывают и выводят микотоксины из ЖКТ) и модификаторы (бактерии, грибы, ферменты и экстракты растений).

Собственно адсорбенты микотоксинов можно разделить на органические — продукты на основе компонентов стенок дрожжей и неорганические — глинистые минералы, например алюмосиликаты, бентониты и цеолиты (Vila-Donat P. et al., 2018). Модификаторы изменяют химическую структуру микотоксинов (биотрансформация) с образованием менее токсичных, чем исходные формы микотоксинов, метаболитов или совсем нетоксичных соединений (Loi M. et al., 2017).

Новая модель исследований

Многие ученые проводили исследования методом *in vitro*, по результатам которых оценивали степень связывания микотоксинов различными типами коммерчески доступных адсорбен-

тов. При этом большинство исследователей изучали свойства препаратов, активных в отношении только одного (чаще всего — афлатоксина В1) или двух микотоксинов (Tengjaroenkul U. et al., 2006; Jaynes W. et al., 2007; Boudergue C. et al., 2009).

Поскольку корма для сельскохозяйственных животных и птицы обычно контаминированы несколькими видами микотоксинов (Binder E. et al., 2007; Streit E. et al., 2012), целью данного исследования стало определение способности десяти различных коммерческих адсорбентов одновременно адсорбировать шесть микотоксинов (ДОН, Т-2 токсин, зеараленон, охратоксин, фумонизин В1 и афлатоксин В1).

Стандартные исследования по оценке эффективности адсорбентов методом *in vitro* не отражают в достаточной степени реальное состояние ЖКТ сельскохозяйственных животных и птицы. Ряд важных факторов, которые могут повлиять на процесс адсорбции (температура, наличие корма, питательных веществ, пищеварительных ферментов и желчных солей, изменение pH), в таких исследованиях часто не учитывают. Поэтому ученые разработали надежную *in vitro*-модель, наиболее точно имитирующую среду ЖКТ моногастрического животного.

Для этого использовали специальный аппарат Vankel VK 7010 (Erweka, Германия), обеспечивающий автоматизированное растворение USP 2 (метод растворения согласно требованиям Американской Фармакопеи — United States Pharmacopeia, USP), с автоматическим многоканальным перистальтическим насосом Vankel VK 810 (Великобритания). В течение всего эксперимента поддерживали температуру тестируемых образцов на уровне 40 °С, последовательно моделируя среду зоба (или пищевода), желудка и кишечника. Общее время инкубации — 4 часа 30 минут.

Десять препаратов с заявленной эффективностью адсорбции в отношении нескольких микотоксинов разделили на три группы в зависимости от основного функционального состава кормовой добавки. В первую группу вошли неорганические адсорбенты, во вторую — органические, в третью — комплексные. Названия продуктов заменили номерами, чтобы сохранить конфиденциальность (табл. 1).

Состав и механизм действия адсорбентов

№ препарата	Основное действующее вещество	Механизм действия
<i>Неорганические адсорбенты</i>		
1	Модифицированные алюмосиликаты	Адсорбция*
2	Бентонит	**
3	Активированная глина	Адсорбция и инактивация*
4	Монтмориллонит	Адсорбция*
<i>Органические адсорбенты</i>		
5	Глюкоманнаны	Адсорбция и комплексообразование*
6	Модифицированные клеточные стенки дрожжей	Адсорбция*
7	Этерифицированные глюкоманнаны	**
<i>Комплексные адсорбенты</i>		
8	Силикаты и клеточные стенки дрожжей	**
9	Алюмосиликат и фермент	Адсорбция и биотрансформация*
10	Природные минералы и водоросли	Адсорбция и расщепление*

* Информация, размещенная в инструкции по применению и на сайтах производителей кормовых добавок.

** Информация отсутствует.

Термин «адсорбция» («связывание») в этой статье используется для обозначения снижения количества свободных микотоксинов в результате воздействия исследуемых кормовых добавок (адсорбентов).

Выбор соотношения адсорбент — микотоксин был обоснован требованиями о максимально допустимой концентрации микотоксинов в кормах для свиней, принятыми в странах Евросоюза (Pinotti L. et al., 2016), и о стандартном (2 г/кг) уровне ввода адсорбента в рацион (EFSA, 2013).

Искусственно загрязненный корм готовили путем добавления в 1 г мелкоизмельченного исходного материала 200 мкл раствора нескольких микотоксинов для достижения следующих концентраций микотоксинов: афлатоксина В1 — 21,2 мкг/кг, охратоксина А — 48,9, ДОНа — 997,2, фумонизина В1 — 5582,3, Т-2 токсина — 243,1, зеараленона — 152,8 мкг/кг.

Для определения концентрации микотоксинов применяли систему Acquity UPLC I-Class в паре с тройным квадрупольным масс-спектрометром (MS) Xevo TQ-S (Waters, Milford, США), что позволяло одновременно анализировать несколько микотоксинов.

Эффективность адсорбции

Показатели эффективности адсорбции микотоксинов (ДОН, зеараленон, фумонизин В1, охратоксин А, Т-2 ток-

син и афлатоксин В1) в модели *in vitro*, разработанной для имитации среды ЖКТ моногастричных животных, представлены в **таблице 2**. Степень адсорбции тестируемых препаратов рассчитывали, исходя из данных, полученных при исследовании контрольных образцов (без кормовых добавок). Все показатели — среднее значение трех измерений.

Неорганические адсорбенты

Алюмосиликаты — наиболее распространенная группа порообразующих минералов (Alaniz C. et al., 2012). Основная структурная единица силикатных глинистых минералов состоит из комбинации октаэдрических слоев, образованных атомами алюминия, и тетраэдрических слоев, образованных атомами кремния (Kerr G., 1966). В большинстве исследований по оценке эффективности связывания микотоксинов (*in vivo* и *in vitro*) глинистыми минералами использовали алюмосиликаты — бентонит, монтмориллонит, целолит и гидратированные алюмосиликаты натрия и кальция (HSCAS).

Мы определяли способность четырех продуктов на основе глин (препараты № 1, 2, 3 и 4) связывать несколько микотоксинов одновременно. Данные более ранних экспериментов, проведенных другими учеными, показали, что глинистые минералы хорошо адсорбировали афлатоксин В1 как в кис-

лой, так и в щелочной среде. В то же время глины практически не связывали другие микотоксины (Boudergue C. et al., 2009; Deng Y. et al., 2010; Ayo E. et al., 2018).

В ходе нашего исследования было установлено, что в условиях, имитирующих среду ЖКТ моногастричных животных, препараты № 2 и 4 не связывали охратоксин А и Т-2 токсин, но связывали афлатоксин В1 (степень адсорбции — 42% и выше). Лучшим в этой группе оказался препарат № 1: уровень адсорбции ДОНа составил 55%, зеараленона — 40, фумонизина В1 — 33, охратоксина А — 25, Т-2 токсина — 26, афлатоксина В1 — 51%.

Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что в целом эффективность связывания микотоксинов неорганическими адсорбентами в условиях, имитирующих среду ЖКТ, была невысокой. Данные нашего исследования согласуются с данными, полученными методом *in vitro* Vekiru и соавт. (2007). Ученые отмечают, что эффективность адсорбции афлатоксина В1 алюмосиликатами, активированным углем и бентонитами существенно ухудшалась при наличии желудочного сока свиней.

Так, при использовании алюмосиликатов степень адсорбции снизилась с 98 до 72%, активированного угля — с 88 до 35%, бентонитов — более чем на 15%. Результаты другого эксперимента также подтвердили, что при моделировании среды ЖКТ способность смектита свя-

Таблица 2

Степень адсорбции микотоксинов кормовыми добавками, %

№ препарата	Действующее вещество	Микотоксин					
		ДОН	зеараленон	фумонизин В1	охратоксин	Т-2 токсин	афлатоксин В1
<i>Неорганические адсорбенты</i>							
1	Модифицированные алюмосиликаты	55 ^b	40 ^b	33 ^c	25 ^c	26 ^c	51 ^b
2	Бентонит	39 ^d	29 ^d	20 ^d	18 ^d	4 ^d	53 ^b
3	Активированная глина	41 ^d	12 ^f	21 ^d	—	—	38 ^c
4	Монтмориллонит	31 ^e	18 ^e	20 ^d	—	2 ^d	42 ^c
<i>Органические адсорбенты</i>							
5	Глюкоманнаны	47 ^c	40 ^b	45 ^b	29 ^b	28 ^c	54 ^b
6	Модифицированные клеточные стенки дрожжей	55 ^b	53 ^a	51 ^a	52 ^a	56 ^a	62 ^a
7	Этерицированные глюкоманнаны	36 ^e	41 ^b	19 ^d	26 ^c	—	39 ^c
<i>Комплексные адсорбенты</i>							
8	Силикаты и клеточные стенки дрожжей	41 ^d	36 ^c	23 ^d	10 ^e	28 ^c	48 ^{bc}
9	Алюмосиликат и фермент	61 ^a	53 ^a	35 ^c	32 ^b	35 ^b	58 ^a
10	Природные минералы и водоросли	22 ^f	8 ^f	—	—	—	29 ^d

Примечание. Буквами отмечены средние показатели со статистически значимой разницей ($p < 0,05$).

зывать афлатоксин уменьшилась более чем в два раза (*Barrientos-Velazquez A. et al.*, 2016).

К тому же безопасность адсорбентов данной группы и их взаимодействие с питательными веществами и ветеринарными препаратами продолжает вызывать обоснованные опасения (*Elliott C. et al.*, 2019).

Органические адсорбенты

Из трех продуктов (№ 5, 6 и 7) только препарат № 6 хорошо адсорбировал все шесть микотоксинов. Отмечено, что степень адсорбции фумонизина В1 (51%), охратоксина А (52%) и Т-2 токсина (56%) препаратом № 6 была достоверно выше, чем степень адсорбции этих микотоксинов остальными девятью адсорбентами ($p < 0,05$).

Данные проводившихся ранее исследований показали, что органические адсорбенты на основе клеточных стенок дрожжей, в отличие от адсорбентов на основе неорганических минералов, обладают высокой связывающей способностью в отношении широкого спектра микотоксинов (*Firmin S. et al.*, 2011). Клеточная стенка дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* состоит из липидной, белковой и полисахаридной фракций. В состав полисахаридной фракции входят глюканы и маннаны (*Faucet-Marquis V. et al.*, 2014).

Rignot и соавт. (2007) установили, что основной компонент клеточной стенки дрожжей, который в значительной степени отвечает за комплексобразование с микотоксинами, — β -D-глюканы. Ученые отмечают, что пространственная конфигурация β -D-глюканов и соотношение между β -(1,6)-D-глюканами и β -(1,3)-D-глюканами — ключевые факторы. От них зависит эффективность адсорбции микотоксинов. В процесс связывания микотоксинов β -D-глюканами вовлечены силы Ван-дер-Ваальса (класс сил межмолекулярного и межатоминового взаимодействия) и водородная связь (*Jouany J.*, 2007). Эффективность адсорбции микотоксинов, которые может связывать адсорбент, полученный из клеточных стенок дрожжей, зависит от особенностей штамма дрожжей и условий их выращивания, сайтов адсорбции, доступной площади поверхности, концентрации в продукте различных компонентов клеточной стенки и рН среды ЖКТ (*Yiannilouris A. et al.*, 2006).

Комплексные адсорбенты

Поскольку большинство добавок адсорбирует микотоксины только одного вида, некоторые производители разработали адсорбенты, содержащие смесь разных компонентов. По заверениям многих производителей, применение таких комбинаций позволяет предот-

вратить отрицательное воздействие на здоровье животных одновременно нескольких микотоксинов. Наиболее распространенный способ производства комплексных адсорбентов — использование комбинации глинистых минералов и клеточных стенок дрожжей (*Boudergue C. et al.*, 2009).

В этом эксперименте изучали свойства трех комплексных добавок. В состав продукта № 8 входили силикаты и клеточные стенки дрожжей, № 9 — клеточные стенки дрожжей и фермент, № 10 — природные глинистые минералы и водоросли. Результаты исследований показали, что в условиях, имитирующих среду ЖКТ моногастрических животных, продукт № 10 практически утратил свой потенциал связывания микотоксинов: степень адсорбции ДОНа, зеараленона и афлатоксина В1 была менее 30%, а какое-либо взаимодействие с фумонизином В1, охратоксином А и Т-2 токсином вовсе отсутствовало. Отмечено, что эффективность двух других продуктов (№ 8 и 9) из этой категории также оказалась низкой в отношении фумонизина В1, охратоксина А и Т-2 токсина (степень адсорбции — 35% и меньше).

На основании полученных данных был сделан вывод о том, что простое смешивание компонентов не гарантирует одновременного связывания нескольких микотоксинов.

Классические адсорбенты связывают микотоксины на своей поверхности,

образуя комплекс микотоксин—адсорбент, после чего связанные микотоксины выводятся из организма. Эффективность адсорбции микотоксинов и стабильность комплексов микотоксин—адсорбент в ЖКТ зависят от физико-химических свойств и адсорбента (полярность, размер пор, доступность сайтов адсорбции, площадь поверхности), и микотоксинов (полярность, растворимость, размер и заряд) (Deng Y. et al., 2010).

Афлатоксин В1 — относительно гидрофильный микотоксин с плоской молекулой. Он легко связывается большинством адсорбентов, особенно препаратами на основе глинистых минералов, путем образования координационных связей с β-карбонильной группой (Boudergue C. et al., 2009). Другие микотоксины — зеараленон, охратоксин А, фумонизин В1, Т-2 токсин и ДОН — варьируют от умеренно гидрофильных до высокогидрофобных соединений, а значит, их адсорбировать намного сложнее (Boudergue C. et al., 2009).

Выводы


В ходе исследований с использованием *in vitro*-модели, имитирующей среду ЖКТ моногастричных животных, было установлено, что только одна из кормовых добавок (продукт №6 на основе модифицированных клеточных стенок дрожжей) одновременно связывала более 50% ДОНа, зеараленона, фумонизина В1, охратоксина А, Т-2 токсина и афлатоксина В1. Остальные препараты умеренно связывали афлатоксин В1 (степень адсорбции 44–58%), а их эффективность в отношении зеараленона, фумонизина В1, охратоксина А и Т-2 токсина оказалась низкой (в отдельных случаях взаимодействия между адсорбентом и микотоксином не зарегистрировали).

Для оценки эффективности адсорбентов *in vitro* следует применять надежный метод, позволяющий имитировать среду ЖКТ моногастричных животных и птицы, а не простые буферные системы с фиксированными значениями рН. Кроме того, производители, заявляющие о наличии адсорбционных

свойств у кормовых добавок и об их эффективности в отношении нескольких микотоксинов, должны обеспечить надежную и детальную маркировку своих продуктов, чтобы не вводить в заблуждение покупателей. Необходимо указывать состав, физико-химические свойства, механизм действия, дозировку и, что особенно важно, названия специфических микотоксинов, которые препарат может связывать, адсорбировать или детоксифицировать.

Статья опубликована в журнале Toxins в ноябре 2019 г. [Oluwatobi Kolawole, Julie Meneely, Brett Greer, Olivier Chevallier, Lisa Connolly, Christopher Elliott (Institute for Global Food Security Queens University Belfast), David S. Jones (School of Pharmacy Queens University Belfast)].

ЖР

ООО «Оллтек»
105062, Москва, 
Подсосенский пер., д. 26, стр. 3
Тел.: +7 (495) 258-25-25
E-mail: russia@alltech.com
www.alltech.com/russia

ЖИВОТНОВОДСТВО РОССИИ

ИЮЛЬ 2020

Н
Е О
Б Н А
Р У Ж Е
Н Н Ы Е
М И К О Т О К С
И Н Ы С Ъ Е Д А Ю Т
В А Ш У Ч И С Т У Ю П Р И Б Ы Л ь

Возьмите угрозу микотоксинов под свой контроль с помощью наших передовых технологий

Погодные условия могут значительно повысить риск контаминации корма микотоксинами, что впоследствии негативно отражается на здоровье животных и прибыльности хозяйства.

Отразите удар с помощью программы Alltech менеджмент микотоксинов: всесторонний подход и инструменты Alltech помогут предотвратить связанные с микотоксинами риски.

Alltech
МЕНЕДЖМЕНТ
МИКОТОКСИНОВ

Alltech[®]

Ваши животные – ваш бизнес. Их защита – наш.

Alltech.com/russia

[f AlltechEurope](#)

[@Alltech](#)