

Микотоксины и отравления грибами

Mycotoxins and fungal poisoning

Санитарное значение заспоренности кормов грибами

Байбакова Ю. П., Хусаинов И. Т.

Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных, Казань

Существуют предельно допустимые нормы заспорения зерна, муки и комбикормов грибами. Комбикорм или зерно, в 1 г которых обнаружено 100 тыс и выше спор грибов, считают неблагополучными по качеству и исследуют для установления пригодности их к скармливанию.

Известно, что комбикорм с нормальными органолептическими показателями, с влажностью в пределах допустимой и нетоксичный может содержать от 4 до 37 тыс спор грибов в 1 г. Комбикорм различной степени токсичности содержит от 100 до 220 тыс спор.

Степень заспорения зерновых культур определяют способы уборки, длительность и условия хранения и качество зерна. Степень заспорения мучнистых кормов: отрубей, мучки, муки, дерти, комбикорма зависит от заспорения сырья и от длительности хранения этих кормов.

На современном этапе наших знаний санитарная оценка качества любого корма выходит далеко за пределы таких показателей, как токсичность, обусловленная микроскопическими грибами. Из важных показателей, которые должны характеризовать санитарное состояние корма, следует учитывать также и количество спор токсических грибов в 1 г корма.

При наличии 10-20 тыс спор токсических грибов в 1 г корма такой корм следует считать опасным для молодняка птицы; 100-200 тыс спор токсических грибов опасны для молодняка свиней, а 500 тыс и большее спор токсических грибов могут вызвать отравление взрослых свиней (рвоту, понос) и крупного рогатого скота.

Споры грибов, попавшие вместе с кормом в желудок, подвергаются там гидролизу, а освобождающиеся токсины вызывают отравления животных. Поэтому при исследовании кормов необходимо проверять токсичность выделенных грибов.

Нами исследована кормовая продукция некоторых сельскохозяйственных предприятий республик Мордовия и Татарстан. По результатам исследования на общую токсичность (биопроба на простейших) отобраны нетоксичные корма (выживаемость простейших 90%) для определения содержания в них диаспор грибов различных видов. Показатель количества спор грибов колебался от 3 до 81 тыс. в 1 г. продукции. Преобладающими являлись изоляты грибов родов *Aspergillus* (до 70%) и *Fusarium* (до 30%). Выделенные изоляты протестированы на токсичность, в результате процентное содержание токсических штаммов р. *Aspergillus* составило в среднем 24%, р. *Fusarium* - 35%.

Таким образом, оценка санитарного качества кормовой продукции с учётом их заспоренности и последующего исследования на токсичность изолятов микроскопических грибов позволяет выявлять микрофлору, влияющую на качество и безопасность кормов в процессе их хранения.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНА В1 В ПИВЕ МЕТОДОМ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНЦЕНТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА

Белоглазова Н. В., Еремин С. А.

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова

Одними из особо опасных загрязнителей продуктов питания можно считать микотоксины-продукты жизнедеятельности микроскопических плесневелых грибов. Микотоксины характеризуются высокой токсичностью, мутагенными и канцерогенными, а в ряде случаев и тератогенными свойствами. В наши дни известно более 200 видов различных плесневелых грибов, производящих более 100 видов токсинов, способных поражать продукты питания, а значит, и проникать в организм человека. Одним из самых опасных микотоксинов является афлатоксин В1, продуцируемый видом *Aspergillus flavus*. Это сильный гепатотропный яд, поражающий в первую очередь печень. Афлатоксин В1 способен поражать различные сельскохозяйственные культуры, в частности, злаки. Именно поэтому определение его в зерне и продуктах из зерна крайне важно.

Проблема контроля содержания этого токсина в продуктах питания стоит в настоящее время достаточно остро. Пиво потребляется в России в больших объемах, а потому его качество строго контролируется. Конечно, существует стандартная методика определения афлатоксина В1 в пиве методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием, однако она требует значительных временных и экономических затрат, связанных с использованием дорогостоящего оборудования, иммуноаффинных колонок для пробоподготовки образцов, больших объемов органических растворителей. Иммунохимические методы, а в частности поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА), лишены этих недостатков: создание портативного поляризационного флуориметра позволило проводить анализы непосредственно на месте в течение достаточно короткого промежутка времени. Чувствительность и селективность ПФИА делает этот метод пригодным для определения токсикантов в продуктах питания и питьевой воде.

Первым шагом в разработке методики определения афлатоксина В1 в пиве данным методом был синтез флуоресцеин-меченных трейсеров. Их структура подтверждалась масс-спектрометрически. Далее, была выбрана оптимальная пара иммунореагентов (антитела-трейсер), после чего была построена калибровочная кривая и рассчитаны метрологические характеристики определения. Предел обнаружения афлатоксина В1 данным методом составил 10 нг/мл, что позволило использовать его для скрининга реальных образцов.

Так как пиво характеризуется сложным матричным эффектом, перед процедурой анализа проводилась предварительная очистка образцов. Пробоподготовку для нивелирования мешающего влияния примесей проводили методом твердофазной экстракции. Был выбран оптимальный сорбент и построена градуировочная кривая на супернатанте для учета оставшегося в образце фона.

Следующим шагом работы было проведение теста на открытие (теста «введено-найдено») для определения количества афлатоксина В1, адсорбированного в очищающей колонке. По данным теста был рассчитан процент открытия, который составил 91%.

Далее был проведен скрининг образцов пива на содержание в них анализируемого токсина. В качестве подтверждающего метода была использована высокоэффективная жидкостная хроматография с флуоресцентным детектированием. Результаты, полученные методом ПФИА, хорошо коррелировались с результатами, полученными при использовании стандартной методики.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКОТОКСИНОВ ДЕОКСИНИВАЛЕНОЛА, ЗЕАРАЛЕНОНА И АФЛАТОКСИНА В1 В ЗЕРНЕ МЕТОДОМ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА

Бондаренко А. П., Еремин С. А.

Химический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва

Микотоксины являются продуктами жизнедеятельности микроскопических грибов, в качестве которых наиболее часто встречаются плесневые грибы рода *Fusarium*. Среди продуктов питания, подверженных такому заражению, особое место отводится зерновым культурам. Микотоксины поражают своим разнообразием, однако среди загрязнителей зерновых продуктов встречаются в первую очередь зеараленон (ЗЕН), деоксиниваленол (ДОН) и афлатоксин В1 (АФ В1). Зеараленон обладает способностью связываться с эстрогенными рецепторами в организме человека и животных и вызывать у последних серьезные нарушения в работе репродуктивной системы. Деоксиниваленол относится к группе трихотеченов и способен вызывать диарею, нарушения репродукции и даже приводить к летальному исходу. Афлатоксин В1 является потенциальным канцерогеном. Он способен угнетать репликацию и транскрипцию ДНК и вызывать различные мутации. В связи с этим необходимо постоянно контролировать уровень данных микотоксинов в продуктах питания. Метод поляризационного флуоресцентного иммуноанализа является одним из наиболее перспективных в данной области, поскольку обладает высокой специфичностью, чувствительностью, экспрессностью, относительно низкой стоимостью и простотой проведения анализа.

В ходе разработки методики поляризационного флуоресцентного иммуноанализа были синтезированы и очищены методом ТСХ трейсеры для каждого из вышеуказанных микотоксинов. В качестве флуоресцентной метки был использован этилендиаминкарбонилфлуоресцеин. Антитела, используемые в работе, являлись моноклональными и были предоставлены коллегами из Кореи и Великобритании. Для каждой из модельных систем был построен градуировочный график и посчитан предел обнаружения по формуле: $mP_{\min} = mP_0 - 3SD$. Он составил:

- ЗЕН 5 нг/мл
- ДОН 50 нг/мл
- АФ В1 4 нг/мл

Все три системы были проверены на предмет перекрестного реагирования между собой. Было выявлено, что каждая пара трейсер - антитело является высокоспецифической к своему антигену и никак не реагирует на присутствие других микотоксинов.

В качестве пробоподготовки для молотого зерна была выбрана экстракция смесью метанол – вода в объемном соотношении 60:40. На каждый грамм исходного сухого продукта брали 5 мл экстракционной смеси. Анализ проводили прямым методом, а также методом добавок. Используя зерно, чистота которого подтверждена альтернативным методом, был проведен тест на открытие. Процент открытия микотоксинов оказался примерно одинаковым и составил около 95%.

Анализ имеющихся у нас реальных образцов зерна показал, что в них отсутствует афлатоксин В₁, однако в значительных количествах присутствуют зеараленон и деоксиниваленон.

ПЕРВЫЕ СВЕДЕНИЯ О КОНТАМИНАЦИИ ЯГЕЛЯ МИКОТОКСИНАМИ

Буркин А. А., Кононенко Г. П.

ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН, Москва

Ягель (олений мох), группа лишайников преимущественно из рода *Cladonia*, является основой рациона северного оленя, относящегося к важнейшим промысловым видам в нашей стране, и почти единственным источником пищи для этих животных в зимний период. Ягель длительное время находится в условиях повышенной влажности и низких температур, которые могут резко активизировать биосинтез токсичных метаболитов у некоторых несовершенных грибов, паразитирующих на растениях. Массовые вспышки отравлений людей и животных зерном, перезимовавшим под снегом, известные как «алиментарная токсическая алейкия», произошли на европейском севере, в центральной России, на Урале и в Сибири (Саркисов, 1949). В этой связи нами был проведен микотоксикологический анализ выборки образцов ягеля из Республики Карелия и Мурманской области, собранных в августе, сентябре и декабре 2009 года.

В образцах определяли 15 микотоксинов - Т-2 токсин (Т-2), диацетоксисцирпенон (ДАС), трихотецены группы дезоксиниваленола (ДОН), зеараленон (ЗЕН), фумонизины (ФУМ), альтернариол (АОЛ), охратоксин А (ОА), цитринин (ЦИТ), стеригматоцистин (СТЕ), афлатоксин В₁ (АВ₁), микофеноловую кислоту (МФК), циклопиазоновую кислоту (ЦПК), эргоалкалоиды (ЭА), эмодин (ЭМО) и PR-токсин (PR) иммуноферментным методом с помощью коммерческих тест-систем и исследовательских наборов реагентов. Результаты выражали в виде частоты встречаемости микотоксинов (отношение числа положительных проб к числу исследованных, $n+/n$) и уровней их накопления (мин. - среднее - макс., мкг/кг).

Для всех образцов ягеля выявлен множественный тип контаминации, в большинстве из них (14/21) содержалось по 5 микотоксинов, а в остальных - комбинации из 2-х, 3-х и 4-х. По частоте встречаемости они располагались следующим образом: СТЕ (21/21, 11 - 138 - 500), ЭМО (19/21, 65 - 1349 - 4000), ДАС (17/21, 115 - 221 - 400), МФК (16/21, 40 - 56 - 144), АОЛ (13/21, 40 - 188 - 708) и ЦИТ (6/21, 40 - 59 - 79). Фузариотоксины (Т-2, ДОН, ЗЕН, ФУМ), а также ОА, АВ₁, ЦПК, PR и ЭА не были обнаружены.

Судя по полученным данным, ягель является весьма привлекательным объектом для паразитирования токсигенных грибов. Факт обнаружения единственного из фузариотоксинов - ДАС и столь высокие уровни его накопления требуют дальнейших исследований для установления природы продуцента, однако уже известно, что *Fusarium poae*, *F. sporotrichioides* и *F. langsethiae* способны его синтезировать (Gagkaeva et al., 2006). Выявление СТЕ во всех образцах указывает на возможность значительной пораженности этих растений грибами рода *Aspergillus*, для которых биосинтез этого метаболита является устойчивым видовым признаком. Недавно показано, что один из таких видов - *A. versicolor* (Vuill.) Tirab. - широко представлен в микобиоте арктических льдов (Ozerskaya et al., 2009). Частые случаи обнаружения МФК и ЦИТ в ягеле связаны, по-видимому, с устойчивой адаптацией к нему специфического комплекса грибов рода *Penicillium*. Среди 12 видов, найденных в многолетнемерзлых грунтах Арктики (Ozerskaya et al., 2009), следует отметить *P. granulatum* Bainier, который способен к интенсивному биосинтезу ЦИТ, а также виды *P. brevicompactum* Dierckx. и *P. puberulum* Bainier, обладающие высокой продуцирующей активностью в отношении МФК (Frisvad, Filtenborg, 1989; Puel et al., 2005; Буркин и др., 2010). Частые случаи индикации АОЛ в количествах до 400 мкг/кг также вполне согласуются с присутствием в микобиоте вечной мерзлоты вида *Alternaria alternata* (Fries) Keissler, который, среди многих других, считают ответственным за контаминацию АОЛ объектов растительного происхождения.

МИКОТОКСИНЫ В КОРМАХ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Буркин А. А., Кононенко Г. П.

ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН, Москва

Широкий спектр исследовательских работ, таких как поиск физиологически активных веществ различной фармакологической направленности, оценка токсических эффектов синтетических и природных соединений, получение диагностических антител, контроль безопасности и эффективности вакцин и сывороток, проводится в нашей стране на конвенциональных и свободных от специфической патогенной микрофлоры лабораторных животных - мышах, крысах, хомяках, морских свинках, кроликах, кошках, собаках и обезьянах. Повышенные требования к качеству кормов для этой категории животных вполне закономерны и подтверждены в соответствующих ТУ предприятий-изготовителей и ГОСТ Р 50258-92. Микотоксины, обладающие широким спектром физиологической активности, относятся к важнейшим показателям безопасности тех видов агропродукции, которые составляют основу таких рецептов. В связи с этим нами проведено выборочное обследование загрязненности комбикормов, применяемых для кормления мышей, крыс и кроликов в условиях промышленного воспроизводства и эксперимента. Отбор 43 проб произведен в период с 1999 по 2009 гг. в ряде московских НИИ

РАН, РАМН, РАСХН и отраслевых институтов, удостоверения качества на все выбранные для обследования партии содержали указания об отсутствии токсичности. В образцах определяли содержание 11 микотоксинов, в их числе Т-2 токсин (Т-2), диацетоксисцирпенол (ДАС), трихотецены группы дезоксиниваленола (ДОН), зеараленон (ЗЕН), альтернариол (АОЛ), охратоксин А (ОА), цитринин (ЦИТ), стеригматоцистин (СТЕ), микофеноловая кислота (МФК), циклопиазоновая кислота (ЦПК) и эргоалкалоиды (ЭА) методом непрямого конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью коммерческих тест-систем и исследовательских наборов реагентов. Результаты выражали как частоту встречаемости (отношение числа положительных проб к числу исследованных, $n+/n$) и уровни содержания (мин. - среднее - макс., мкг/кг).

Корма для кроликов имели множественный характер контаминации микотоксинами. По частоте встречаемости токсины располагались в ряд: Т-2 (20/21, 8-56-305), АОЛ (10/10, 20-136-610), ЭА (9/10, 13-53-208), ОА (14/19, 5-10-42), МФК (5/10, 20-34-64), ДАС (5/11, 50-135-184), СТЕ (6/15, 12-25-50), ЦИТ (4/11, 20-24-32), ЗЕН (6/20, 4-17-34), ЦПК (2/10, 50, 175), ДОН (2/13, 40, 126). Значительное распространение имели Т-2 и ДАС, а также ОА и МФК, обладающие выраженной иммунодепрессивной активностью, для ЦИТ, присутствующего совместно с ОА, известно синергическое действие. Значительная распространенность и высокие уровни содержания Т-2, ДАС и АОЛ могли быть связаны с включением в рецепты, кроме зерна, таких ингредиентов как жмыхи, шроты и травяная мука. В кормах для мышей и крыс наиболее частыми были Т-2 (20/22, 6-(14)-35) и ЭА (13/19, 7-(17)-63), далее следовали АОЛ (8/19, 20-(23)-47) и ОА (5/24, 4-(10)-18) и редко обнаруживались ДОН (2/21, 50, 60), ЗЕН (1/22, 28), ЦИТ (1/19, 31) и СТЕ (1/20, 4). Из 19 обследованных по всему перечню показателей образцов 5 содержали только Т-2, 5 – Т-2 и ЭА, 6 – сочетания Т-2+ЭА+ОА, Т-2+ЭА+АОЛ и Т-2+ОА+АОЛ, а остальные 3 – комбинации из 4, 5 и 6 токсинов. ДАС, МФК и ЦПК не были найдены. Меньшие уровни загрязнения трихотеценовыми микотоксинами и АОЛ, а также отсутствие некоторых из них, объясняются тем, что единственным растительным компонентом в них являются злаки.

Выявленный факт неблагополучия кормов для лабораторных животных является серьезным поводом для пересмотра действующих в стране правил оценки их токсичности в биопробах на коже кролика и инфузориях.

МИКОТОКСИНЫ КАК ВОЗМОЖНЫЕ МАРКЕРЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО РАВНОВЕСИЯ В БИОСИСТЕМАХ

Буркин А. А., Кононенко Г. П.

ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН, Москва

Колебания климатических факторов, обострившиеся в последние десятилетия, и нежелательные изменения в составе грибов *Fusarium*, поражающих культурные злаки, находятся в центре внимания исследователей северных Европейских стран. Общая динамика накопления токсинов, наблюдаемая в зерне, в целом соответствует тенденции распространения основных токсигенных видов (Elen et al., 2006; Nistrup, 2009; Nielsen, 2009). Однако, возделываемые зерновые культуры, подверженные воздействиям различных агротехнических приемов, переносу семенного материала и т. д., менее пригодны для долгосрочных наблюдений, чем самосеющиеся растения, поскольку для них такие побочные влияния ограничены или вообще отсутствуют.

Северная территория Европейской части России, практически не затронутая сельскохозяйственной деятельностью, может рассматриваться как автономная биосистема. В 2009 году нами было предпринято первое микотоксинологическое обследование дикорастущих злаков в Северной Карелии на границе арктической зоны с отбором проб вдоль побережья Белого моря на участке протяженностью около 150 км между двумя биостанциями – СПб университета на юге и МГУ на севере.

Каждая проба состояла из 4-5 колосьев близко расположенных растений, в их числе были колосняк песчаный (*Leymus arenarius*), пырей ползучий (*Elytrigia repens*), лисохвост (*Alopecurus*) и тимopheевка (*Phleum*). Всего было отобрано 55 образцов, экстракцию размолотого материала проводили смесью ацетонитрила и воды в 10-кратном избытке к навеске, и экстракты далее использовали в ИФА после 10-кратного разбавления буферным раствором.

В 10-ти пробах колосняка был найден диацетоксисцирпенол (ДАС) в количествах от 100 до 251 мкг/кг со средним уровнем содержания 154 мкг/кг. На южном участке, открытом к морю, он присутствовал в 8 из 13 собранных проб, а на более закрытом северном - в 2 из 17. Контаминацию ДАС имели также 3 пробы пырея из 10 на уровнях 209, 211 и 376 мкг/кг. Другие фузариотоксины, в том числе структурно близкие ДАС трихотецены Т-2 токсин и НТ-2, не были обнаружены. Поскольку у тимopheевки и лисохвоста контаминация фузариотоксинами отсутствовала, *Leymus arenarius* и *Elytrigia repens* признаны перспективными объектами для дальнейшего изучения последствий фузариозного поражения злаков.

ДАС является крайне редким контаминантом в кормовой продукции, и за 3-х летний период исследований мы не имели ни одного случая его обнаружения в зерне при практически повсеместной встречаемости Т-2 токсина. Частое обнаружение ДАС в дикорастущих злаках явилось неожиданным результатом и могло быть следствием формирования в условиях севера особого по видовому составу комплекса фитопатогенных видов *Fusarium* или атипичных по токсинообразованию популяций. Интересно отметить, что три культуры, выделенные из колосняка в 1998-99 гг. вблизи Северного полярного круга, были отнесены к видам *F. sporotrichioides* и *F. avenaceum*.

В образцах колосняка (10/30, 40–79 мкг/кг), пырея (2/10, 40, 135 мкг/кг) и с наибольшей частотой и уровнями содержания у тимофеевки (6/8, 40–2500 мкг/кг) обнаружен альтернариол, один из токсинов грибов рода *Alternaria*. Этот токсин, наряду с ДАС, может быть использован в качестве маркера при оценке экологической ситуации в данном регионе. При продолжении исследований целесообразно проводить одновременный микологический анализ объектов, а также оценку контаминации других распространенных видов злаков, таких как костер (*Bromus L.*) и мятлик (*Poa L.*).

НОВАЯ ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ АНАЛИЗА ФУМОНИЗИНОВ (В₁, В₂, В₃) **Буркин А. А., Кононенко Г. П.** **ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН, Москва**

В последние годы фумонизины становятся наиболее исследуемыми микотоксинами, опережая в этом ряду афлатоксины, что связано с высоким уровнем их опасности и широким распространением в районах возделывания или потребления кукурузного зерна. Помимо гепатоканцерогенности и специфических острых форм интоксикаций у сельскохозяйственных животных (лошади, свиньи), они способны вызывать серьезные нарушения функции почек и сердца животных, рассматривается их причастность к этиологии рака мозга человека, эндемического рака пищевода населения и эклампсии женщин в Южной Африке (Dutton M. F., 2004). Для оценки реальных рисков вместо длительных, трудоемких и затратных мониторинговых исследований агропродукции все большее развитие получают приемы прижизненной индикации токсинов в биологических жидкостях или в образцах отчуждаемых тканей животных и человека с помощью высокочувствительных аналитических методов (Sewram et al., 2001).

Ранее на основе поликлональных антител к конъюгату фумонизина В₁ (ФВ₁) с пероксидазой хрена нами был разработан непрямой твердофазный конкурентный иммуноферментный анализ (ИФА) с чувствительностью 4 нг/мл, который был успешно применен для оценки загрязненности зерна и кормов (Кононенко и др., 1999). В последующем попытки по улучшению чувствительности анализа были продолжены. Так, в ходе иммунизации кроликов конъюгатом ФВ₁ со столбнячным анатоксином, синтезированным в присутствии глутарового альдегида, были получены антитела, которые в сочетании с гетерологичным по носителю твердофазным антигеном – конъюгатом ФВ₁ с желатином – обеспечивали определение токсина в растворах в минимальной концентрации 0,4 нг/мл. Это позволило рекомендовать данную тест-систему для анализа кормов до уровня содержаний 20 мкг/кг (ГОСТ Р 52471-2005).

Продолжение исследований с этими антителами показало, что выбор гетерологичного по носителю и способу синтеза твердофазного антигена – конъюгата с кислым гликопротеином, полученного в реакции периодатного окисления – приводит к значительному увеличению чувствительности анализа вплоть до 0,01 нг/мл. Специфичность анализа при этом сохранилась прежней – перекрестная реактивность в отношении ФВ₁, ФВ₂ и ФВ₃ составила 100, 126 и 117%, соответственно.

Учитывая то, что для жидкостной экстракции, как правило, заведомо достаточен 10-кратный объем растворителей, с помощью данной тест-системы оказалось возможным проводить измерение содержания этих токсинов до уровня 1 мкг/кг. Как показывают результаты практических обследований, выполненных методом ВЭЖХ–масс-спектрометрии, уровни накопления фумонизинов В₁, В₂, В₃ в образцах волос у местного населения Южной Африки достигают десятков мкг/кг (Vikash et al., 2003). Широко применяемый хроматографический метод обнаружения ФВ₁ в моче людей рассчитан на минимальную концентрацию 10 нг/мл (Shetty P. H., Bhat R. V., 1998). Предложенный недавно в Японии метод для анализа фумонизинов В₁, В₂ в пиве на основе ВЭЖХ–танDEMной масс-спектрометрии обеспечивал измерение концентраций от 5 нг/мл (Suga et al., 2004), а использование ИФА для оценки возможной фоновой контаминации пива подтвердило высокую чувствительность этого метода, равную 0,8 нг/мл (Буркин, Кононенко, 2007).

Таким образом, аналитические возможности новой тест-системы вполне достаточны для выявления низких уровней содержания фумонизинов группы В в различных объектах эпидемиологического, гигиенического и ветеринарно-санитарного надзора.

ВЛИЯНИЕ ТИМАЛИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНИТЕТА ПРИ Т-2 ТОКСИКОЗЕ

Валиев А. Р., Семенов Э. И., Тремасов М. Я.

Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных, Казань

Среди известных микотоксинов большую опасность для животных и человека представляет Т-2 токсин. Известно о негативном действии Т-2 токсина на иммунную систему. У всех видов животных при Т-2 токсикозе достаточно быстро при низких концентрациях развивается лейкоцитопения. Гематологические изменения сопровождаются дегенеративными изменениями кровяных и иммунокомпетентных органов.

Интерес к иммуностимулирующей терапии резко возрос в последние годы и связан прежде всего с решением задач, выдвигаемых инфекционной патологией. Достижения иммунофармакологии последних лет позволяют по-новому подойти к проблеме неспецифической иммуностимуляции.

Имеются данные об иммуностимулирующих свойствах липополисахаридов (левамизол, пирогенал, продигиозан и др.), вакцин, препаратов нуклеиновых кислот и синтетических нуклеотидов, гормональных средств, препаратов тимуса и др. В последние десятилетия все большее внимание исследователей привлекают препараты нового класса иммуномодуляторов – пептидные биорегуляторы, полученные путем экстракции и очистки из органов и тканей животных. Одним из представителей такого класса является тималин – препарат, полученный из вилочковой железы телят. Выраженное профилактическое действие тималина наблюдали и при микотоксикозах.

Исследования выполнялись в отделе токсикологии Центра. Т-2 токсин вводили белым крысам перорально в виде 5% водно – спиртового раствора в дозе 1/20 ЛД₅₀ в течение 30 дней. Тималин вводили перорально в дозе 60 мг/кг за 5 дней до интоксикации и в течение 30 суток.

В группах белых крыс, которым задавали Т-2 токсин и тималин, количество эритроцитов, лейкоцитов и уровень гемоглобина на 7, 9, 7, 5 и 5, 0 % были выше, чем у крыс контрольной группы, получавших лишь Т-2 токсин без иммуномодулятора.

Количество Т и В клеток в первой группе (животные получали Т-2 токсин и тималин) содержание Т-, и В-лимфоцитов изменялось следующим образом: количество Т – клеток на 5 сутки увеличивалось на 3, 2 %. Далее этот показатель снижался и, на 15 и 30 сутки составил 6, 4 и 8, 8 % ниже исходных данных, однако, он на 9, 6 % был выше по сравнению с группой, где животным задавали только Т-2 токсин. Содержание В – лимфоцитов через 5 суток увеличивалось на 1, 9 %, но через 15 суток произошло снижение данного показателя на 9, 5, а через 30 суток – на 7, 4 % ниже фона, в то же время эти данные были выше контрольных значений на 9, 8 %.

У животных, получавших Т-2 токсин и тималин, через 5 суток после начала опыта фагоцитарная активность (ФА) увеличилась на 3, 7, через 15 и 30 суток – понижалась на 6, 8 и 9, 3 % соответственно ниже фона, что, однако на 12, 7 % было выше контрольных данных. Лизоцимная активность сыворотки крови на 5, 15 и 30 сутки снижалась на 4, 0, 7, 9 и 6, 5 % ниже исходных величин, что по сравнению с показателями в группе биологического контроля было на 4, 8 % выше.

Таким образом, применение тималина оказало положительное влияние на течение микотоксикоза, при этом, наблюдаемое снижение гематологических и иммунологических показателей были менее значительными, чем в контрольной группе, которые получали только микотоксин, следовательно, тималин способствует повышению устойчивости организма животных к действию Т-2 токсина.

ВЛИЯНИЕ ЭКОТОКСИКАНТОВ НА ЗАГРЯЗНЕНИЕ АГРОПРОДУКЦИИ ТОКСИЧНЫМИ ГРИБАМИ **Валиуллин Л. Р., Семенов Э. И., Чернов А. Н., Жестков Н. Н., Конюхова В. А.** **Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных, Казань**

Изменение процентного соотношения тех или иных видов грибов в почве во многом зависит от уровня её агротехногенного загрязнения. Усиление химизации и обводнение ранее засушливых районов, нерациональное применение регуляторов роста, фунгицидов, пестицидов, биологических средств защиты и корректоров иммунного статуса растений приводят к серьезным нарушениям экологического равновесия и возникновению все более опасных проявлений пораженности растений микроскопическими грибами, а в дальнейшем загрязнение их микотоксинами. Экономический ущерб, наносимый сельскому хозяйству микотоксинами, определяется не только прямыми потерями продуктов питания и кормов и резким снижением их пищевой и кормовой ценности, но и затратами, необходимыми на организацию системы контроля и проведение детоксикации загрязненных продуктов и кормов.

Длительное кормление кормами, содержащими микотоксины, у животных ведет к сокращению потребления корма, низкому среднесуточному приросту, снижению молочной продуктивности, увеличению количества абортотворения и эмбриональной смертности. У животных наблюдается слабая охота, неправильный цикл воспроизводства, снижение коэффициента оплодотворения, задержка плаценты и метриты, а также иммуносупрессия что сопровождается возрастанием чувствительности к инфекционным заболеваниям, нарушается обмен веществ, наблюдается кетоз, смещение сычуга, «жирная печень» и т. д.

Источниками опасных для человека микотоксинов могут быть как продукты растительного происхождения (кукуруза, пшеница, рис, арахис и другие культуры), так и продукты животного происхождения. Продукты животного происхождения (мясо, молоко и др.) может представлять реальную угрозу здоровью человека, если при его выращивании использовались корма, пораженные микотоксинами. Как следствие этого, в последние десятилетия отмечается общее ухудшение микотоксикологической ситуации.

Нами проведено сравнительное изучение уровня загрязнения почвы экотоксикантами, оценка его влияния на формирование видового соотношения микромицетов и загрязненность растений микотоксинами.

В опытах всего было исследовано 40 образцов концентрированных и грубых кормов, 10 образцов почв, доставленных из Ростовской, Волгоградской областей, Республики Татарстан, Мордовии. Выделено 100 изолятов грибов. При анализе нитратов в почве содержание токсикантов было больше нормы в 2, 6, 7, 5 и 10, 4 раза, в 1, 5-3, 5 раза содержание токсичных элементов, соответственно. При проведении опытов было выявлено преобладание грибов рода *Fusarium*, *Aspergillus Mucor*, *Penicillium* и др. которые являются продуцентами микотоксинов (Т-2 токсин, зеараленон, афлотоксины, патулин и др.). Выделенные штаммы микроскопических грибов проявили токсические свойства в

отношении простейших 6 штаммов, слаботоксичными были 4 штамма, токсические штаммы микромицетов преимущественно изолировались в зонах с превышением в почве нитратов и токсических элементов.

Полученные данные свидетельствуют о доминировании токсигенных грибов в тех почвах, где уровень загрязнения экотоксикантами превышал норму, что создаёт опасную микотоксикологическую ситуацию в данных районах.

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ГРИБНЫХ ПОРОШКОВ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КУЛИНАРНЫХ ИЗДЕЛИЯХ

Владимирова С. Ф., Артамонов С. А., Мухутдинова С. М., Жарикова Г. Г.
Российская экономическая академия имени Г. В. Плеханова, Москва

В лаборатории микробиологии и биохимии РЭА имени Г. В. Плеханова на протяжении ряда лет ведутся исследования по изучению жизненного цикла белого гриба (*B. edulis*), а также использование продуктов его переработки в кулинарных изделиях.

В качестве объектов исследования данной работы взяты грибные порошки из сушеных белых грибов, вешенки и шампиньонов. Грибной порошок получали из сушеных грибов. Высушенные грибы измельчали на кофемолке. Полученный порошок просеивали через сито величиной пор до 1 мм, крупные частички еще раз просушивали и вновь измельчали. Причем, чем тоньше и мельче частицы порошка, тем лучше будет он распределяться при приготовлении различных кулинарных блюд.

Исследована безопасность грибных порошков из сушеных белых грибов по микробиологическим и физико-химическим показателям. Определено содержание регламентируемых микроорганизмов: мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), бактерии группы кишечной палочки (БГКП), дрожжей и плесневых грибов, патогенных микроорганизмов, в том числе сальмонелл. Показано, что по всем показателям грибные порошки отвечают требованиям нормативных документов (СанПиН).

Проведенное комплексное исследование качества грибных порошков показало, что они могут быть рекомендованы к использованию как товара для розничной сети, так и сырья для кулинарных изделий.

Произведена оценка качества по физико-химическим показателям влажности, наличия токсичных элементов и радионуклидов. По результатам измерений влажности, токсичных элементов и удельной активности техногенных радионуклидов ^{137}Cs и ^{90}Sr данная продукция может быть признана соответствующей нормативам СанПиН 2.3.2.1078-01.

Кроме количественного определения проведено определение до вида некоторых выделенных и идентифицированных плесневых грибов: *Geotrichum klebahnii* (Stautz) Morenz, *Arthriniium arundinis* (Corda) Duko et B. Sutton, *Eophiala jeanselmei* var. *lecanii-corni* (Benedek et G. Specht) de Hoog и одного стерильного мицелия. Данные виды мицелиальных грибов по российскому законодательству не входят в 1-4 группы патогенности. Подобные грибы специфичны и не выделялись из других пищевых продуктов.

Были исследованы 2 серии кулинарных изделий. Первая серия опытов была посвящена приготовлению супов и соусов (температура приготовления 100°C) с использованием грибных порошков в следующих вариантах: отдельно белые грибы, смесь грибных порошков (белые грибы + вешенки и белые грибы + шампиньоны). Приготовленные изделия получили положительную оценку дегустаторов.

Вторая серия опытов была посвящена выпечным изделиям. Были выпечены: кулебяка, пирожки (с различными начинками) и крекеры. При дегустации выпечных изделий были получены неожиданные результаты. Если при дегустации супов и соусов аромат белых грибов более или менее ярко проявлялся, то при выпечке крекеров в лабораторных условиях, при температуре 180°C , грибной аромат концентрированно заполнял всю лабораторию, но, к сожалению, не остался в ощутимых для дегустаторов количествах в выпечных изделиях.

В настоящее время ведутся поиски условий удержания аромата гриба при выпечке.

КОНТАМИНИРОВАННОСТЬ ИМПОРТИРУЕМЫХ СПЕЦИЙ КСЕРОФИТНЫМИ ВИДАМИ ИЗ РОДА *ASPERGILLUS*

Григорян К. М., Саргсян М. Р., Акопян Л. Л., Бадалян Г. Н.
Ереванский государственный университет, Ереван

Исследовано 60 образцов импортируемых специй, следующих наименований - гвоздика (*Cinnamomum L.*), мускатный орех (*Muystica L.*), кардамон (*Elettaria cardamomum*), кмин (*Cuminum cyminum*), тмин (*Carum carvi*), маалеб (*Cerasus maaleb*), имбирь (*Zingiber L.*), шафран (*Crocus L.*). В исследуемых специях определялись активность воды (a_w), степень засоренности и частота встречаемости мицелиальных грибов. Описание и идентификация выделенных культур проводилась с использованием следующих питательных сред: Малът экстракт агар MEА (M-137, HiMedia), Чапек-Докс агар CDA (M-075, HiMedia), в соответствии с руководствами (Samson, Games, 1985; Samson, 2000).

При проведении микологического анализа использованы методы разведения и непосредственного посева образцов специй на питательные среды, после их предварительной повехностной стерилизации раствором гипохлорита натрия.

В результате микологического анализа выделены и идентифицированы 29 видов из рода *Aspergillus*, которые относятся к 5 под родам – *Aspergillus*, *Ornati*, *Nidulantes*, *Circumdati*, *Fumigati* и 9 секциям – *Aspergillus*, *Restricti*, *Fumigati*, *Nidulantes Versicolores*, *Flavipedes*, *Flavi*, *Nigri*, *Circumdati*, в соответствии с (Gams et al., 1985; Frisvad et al., 1990; Samson, Pitt, 2000). Наибольшей степенью заспоренности ксерофитными грибами отличались образцы специй, в которых значение активности воды не превышала $a_w < 0.60$. К их числу принадлежали – мускатный орех, гвоздика, корица, кмин, тмин, маaleb. В указанных специях отмечается доминирование следующих ксерофитных видов *A. restrictus*, *A. penicilloides*, *A. ornatus*, *A. spinulosus*, *A. egypticus*, *A. crustosus*, *A. multicolor*, *A. rugulosus*. Наиболее высокая степень заспоренности аспергиллами наблюдалась при анализе образцов кардамона ($> 10^5$ кое/г). Из проанализированных образцов идентифицированы 10 видов, среди которых доминировали виды – *A. glaucus* и *A. niveo-glaucus*. Указанные виды способны развиваться при минимальных значениях активности воды и относительной влажности субстрата. *A. glaucus* и *A. niveo-glaucus* в подавляющем большинстве случаев встречались в сумчатой стадии. Наименьшая степень заспоренности мицелиальными грибами отмечена в образцах гвоздики и не молотого имбиря.

Из импортируемых специй также идентифицированы потенциальные продуценты микотоксинов – *A. flavus*, *A. notius*, *A. parasiticus*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. ochraceus*, *A. nidulans*. Продуценты афлатоксина А обнаружены в 95% проанализированных образцов. Отмечается высокая степень заспоренности образцов маалеба и шаффрана видом *A. carbonarius* – активным продуцентом охратоксина А.

СОЧЕТАННЫЙ Т-2 И ДЕЛЬТАМЕТРИН ТОКСИКОЗ

Егоров В. И., Галютдинова Г. Г., Иванов А. В.

Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных, Казань

Качество и безопасность кормов для сельскохозяйственных животных существенно зависит от качества и безопасности зерна, использующегося в кормовом производстве. За последние годы пришло осознание того, что для повышения эффективности животноводства необходимо добиваться не только высоких физико-химических показателей зернового сырья, но также и следить за его микробиологическим состоянием, в частности за контаминированием микроскопическими плесневыми грибами, которые могут быть причиной резкого ухудшения его потребительских качеств и свести на нет все усилия по повышению биологической полноценности кормов. Кроме того, многие микромицеты могут продуцировать опасные для человека и животных метаболиты – микотоксины, причем корма могут поражаться сразу несколькими микотоксинами.

До настоящего времени считаются малоизученными смешанные микотоксикозы, возникающие при одновременном поступлении с кормом нескольких микотоксинов. Многолетний анализ проведенных исследований показал, что в условиях производства, как правило, недооценивают негативный эффект присутствия сразу нескольких микотоксинов в столь малых концентрациях и не исключают данные корма из рациона животных. Однако известно, что одновременное присутствие нескольких микотоксинов даже на уровне ПДК вовсе не гарантирует отсутствие токсического эффекта. Смешанные микотоксикозы, как правило, сопровождаются более выраженными клиническими, гематологическими, биохимическими и патоморфологическими изменениями.

Усиление токсического воздействия кормов загрязненных микотоксинами нередко происходит на фоне одновременной их контаминации с соединениями антропогенного происхождения, например синтетическими пиретроидами.

Нами накоплено достаточно свидетельств, о том, что существующие ПДК микотоксинов и пиретроидов не могут обеспечить безопасность кормов и производимой продукции, особенно при смешанном воздействии токсикантов. Все перечисленное выше в полном объеме ставит проблему обеспечения населения экологически безопасной продукцией сельскохозяйственного производства в число наиболее острых проблем, стоящих перед АПК Российской Федерации.

В связи с вышеизложенным, были проведены комплексные исследования по изучению сочетанного воздействия синтетического пиретроида (дельтаметрина) и микотоксина (Т-2 токсина) на организм крыс, кроликов и овец: определены острая токсичность, кумулятивные, эмбриотоксические и тератогенные свойства, где установлено их взаимоусиливающее действие. Так в группе крыс, получавших совместно дельтаметрин и Т-2 токсин, доимплантационная гибель плодов увеличилась относительно контроля на 40, 5%, постимплантационная гибель на 47%, общая эмбриональная смертность на 41%.

При изучении тератогенного эффекта, вызываемого сочетанным воздействием дельтаметрина и Т-2 токсина, выявили увеличение процента мёртворождений и постнатальной смертности. Наиболее высокий рост мёртворождений наблюдался в группе получавшей совместное воздействие дельтаметрина и Т-2 токсина, и был выше относительно контроля в 2, 2 раза. При внешнем осмотре новорождённых крысят выявили отставание в формировании хвостовых позвонков, пястных и плюсневых костей.

Таким образом, сочетанное поступление синтетического пиретроида и микотоксина в организм животных вызывают взаимоусиливающее действие, что следует учитывать при санитарной оценке кормов и диагностике отравлений.

МИКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЗЕРНА. ОПЫТ МЕЖНАЦИОНАЛЬНОГО СОТРУДНИЧЕСТВА

Жуковский А. Г., Буркин А. А., Кононенко Г. П.

Институт защиты растений, Прилуки

ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Россельхозакадемии, Москва

После эпифитотии, охватившей в 1985-89 гг. обширный регион зерносеяния (Краснодарский край, Ставропольский край, юг Ростовской области), проблема фузариозного поражения зерновых культур в России изучается очень активно (Кравченко и др., 1998; Обольский и др., 2001; Кононенко, Буркин, 2008, 2009; Гаврилова и др., 2009, 2010). В 2003 году Белорусский государственный ветеринарный центр совместно с ВНИИВСГЭ организовал первый масштабный проект по обследованию урожая зерна в Республике Беларусь. Результаты, полученные на выборке достаточно большого объема (1091 проба из 6 областей), показали, что Т-2 токсин (Т-2) и трихотецены группы дезоксиниваленола (ДОН) встречаются в зерне с частотой 31, 3% и 27, 4%. Наибольшая степень загрязненности Т-2, судя по усредненным значениям уровней накопления, наблюдалась у овса (52, 8%, 108 мкг/кг), ячменя (29, 5%, 118 мкг/кг) и тритикале (21, 3%, 125 мкг/кг). ДОН преимущественно был обнаружен в тритикале и пшенице с частотой 38, 0% и 40, 0%, но высокие уровни (более 1000 мкг/кг) чаще отмечались у овса, пшеницы, ржи и ячменя. Зеараленон (ЗЕН) встречался в зерне гораздо реже - в 1, 7% случаев.

В зерне ячменя и овса урожая 2006-2007 гг. на территории России (Великолукский район Псковской области) в 6-ти из 10-ти образцов также присутствовал ДОН в количествах 20-239 мкг/кг и в 7-ми - Т-2 (4-110 мкг/кг). В данной работе представлены результаты изучения характера загрязненности фузариотоксинами зерна урожая 2009 году на приграничных территориях Витебской, Могилевской и Гомельской областей, предпринятого нами в рамках продолжения международного творческого сотрудничества.

Встречаемость Т-2 в целом составила 43, 9% (119 положительных проб из 271), и этот показатель по Витебской области (27, 0%) был ниже, чем в Могилевской (54, 1%) и Гомельской (53, 1%) областях. Этот токсин был выявлен в 42 пробах овса из 58, гораздо чаще, чем в других видах зерна. Уровни накопления Т-2, представленные в виде средних значений, были равны 43, 9 мкг/кг (пшеница), 27, 2 (овес), 22, 6 (ячмень), 14, 6 (рожь) и 9, 2 (тритикале). Положительными при анализе ДОН были 86, 0% образцов зерна, в том числе в Витебской - 84, 0%, Могилевской - 91, 8% и Гомельской - 75, 5%. На фоне загрязненности всех исследованных образцов тритикале (48/48) и частого обнаружения у пшеницы (51/54) и ржи (47/55) усредненные величины накопления ДОН для этих видов зерна оказались высокими и выражались значениями 2474, 1150 и 1074 мкг/кг, а в отдельных образцах достигали 6295 мкг/кг. Контаминация ЗЕН установлена для 21, 4% проб в широком диапазоне содержаний от 20 до 1815 мкг/кг, его в основном находили в зерне тритикале, при этом отмечалась отчетливая корреляция между частотой его индикации и случаями высоких уровней накопления ДОН.

Полученные результаты являются свидетельством явного обострения микотоксикологической ситуации. Это может быть обусловлено тем, что в период, наиболее благоприятный для заражения зерновых культур грибами рода *Fusarium* (стадия цветения), сложились погодные условия (повышенное количество осадков в июне-июле, 96 - 295% от нормы, на фоне оптимальных среднесуточных температур), способствующие развитию фузариоза колоса. Судя по характеру контаминации, зерно было интенсивно инфицировано грибом *Fusarium graminearum* Schw. (Леонов и др., 1990).

ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ УТИЛИЗАЦИИ ПОЛИУРЕТАНА

Зачиняев Я. В., Мирошниченко И. И., Зачиняева А. В.

Российская Военно-Медицинская Академия, Санкт-Петербург

Петербургский государственный университет путей сообщения

В настоящее время в крупных мегаполисах ежегодно образуется до 1 млн. промышленных отходов, среди которых 50 тыс. т приходится на полимеры. Одним из распространенных способов утилизации отработанных полимерных материалов остается компостирование. Содержимое свалок, постепенно разлагаясь, отравляет окружающую среду продуктами распада, и, хотя полимеры и являются достаточно инертными компонентами мусора, они также постепенно разрушаются, выделяя опасные для живых организмов вещества, в том числе свертывающие соединения диоксинового и фуранового ряда.

Исследования процессов компостирования в почвах различного зонального ряда образцов полиуретана линейного и трёхмерного строения в течение 20 месяцев показали, что результатом этого процесса стало формирование в почвах «трансформированного» биогеоценоза, в котором присутствуют патогенные для человека и растений микроорганизмы. Следствием этого процесса стал определенный видовой состав и концентрация микробиоты в окружающей среде, которые определяют этиологию инфекций в регионе.

Одним из проявлением патогенных свойств микроорганизмов является их способность расти при температуре тела человека. Такими свойствами обладали: *Verticillium nigriscens*, *Sporotrichum roseolum*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium funiculosum*,

P. decumbens, *P. nigricans*. Определенным видам микромицетов свойственно образование токсичных метаболитов, например, гемотоксинов, вызывающих лизис эритроцитов. Гемолитическая активность была выявлена у грибов, участвующих в процессе обрастания полимера: *Fusarium oxysporum*, *Verticillium terrestre*, *Trichoderma harsianum*, *Penicillium brevicompactum*, *P. fellutanum*, *P. funiculosum*, *P. aurantiogriseum*. Особую опасность для человека представляют грибы, которые наряду со способностью расти при температуре 37° С, обладают плазмокоагуляционной активностью: *Verticillium nigrescens*, *Fusarium oxysporum*, так как выявленные у них факторы патогенности позволяют отнести их к потенциальным возбудителям заболеваний человека. Они способны вызвать заболевание человека в результате:

1. Прямой инфекции. Этот вид заболеваний встречается редко и преимущественно у больных с серьезными иммунодефицитными состояниями.
2. Аллергической реакции. Они обычно обусловлены вдыханием или попаданием на слизистые оболочки спор грибов.
3. Интоксикации.

Среди микромицетов, выделенных нами с поверхности полимера и почвенных образцов, отмечены грибы, обладающие фитопатогенными свойствами. Исследование воздействия культуральной жидкости на прорастание семян пшеницы, гороха и овса показало, что наиболее токсичными микромицетами были *Verticillium terrestre* и *Penicillium nigricans*, которые ингибировали рост корня и всхожесть семян всех взятых в опыт растений, а также *Fusarium oxysporum*, поскольку снижение всхожести семян овса и угнетение роста их корней составила более 30% по сравнению с контролем.

Таким образом, утилизация полиуретанов различного строения представляет экологическую опасность не только в связи с образованием токсичных химических соединений, но и с риском контаминации окружающей природной среды патогенными микроорганизмами, которые получают доминирующее развитие в результате антропогенной трансформации микробных сообществ биогеоценоза.

О ПРИЧИНАХ МАССОВЫХ МИКОТОКСИКОЗОВ ЖИВОТНЫХ

Иванов А. В., Тремасов М. Я., Папуниди К. Х., Семенов Э. И., Титова В. Ю., Шангараев Н. А., Конюхова В. А.

Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных, Казань

В современных условиях ведения животноводства корма часто загрязняются различными экотоксикантами, природного (микотоксикозы) и техногенного происхождения, представляющими реальную опасность для человека и животных. Несоблюдение сроков уборки урожая и правил хранения кормов, сроков внесения пестицидов на поля, нарушение режима их применения приводит к массовым отравлениям и падежу сельскохозяйственных животных.

В прецизионном центре проведено выяснение причин заболеваний и гибели сельскохозяйственных животных и рыбы на сельскохозяйственных предприятиях Нижегородской, Волгоградской, Смоленской, Ростовской областей, в республиках Татарстан, Мордовия, Марий-Эл и Удмуртия.

Экспертизу кормов, с.-х. продукции, патматериала, крови на наличие токсикантов различного происхождения - микотоксинов, пестицидов, токсичных элементов, нитратов-нитритов, ядов неизвестного происхождения, а также бактерий и вирусов проводили с помощью газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии, хроматомасспектрометрии, атомноабсорбционной спектрометрии, ионометрии, колориметрии и иммуноферментного анализа.

Проводился ситуационный анализ в хозяйствах с учетом клиники болезни, характера заболевания, связи болезни с потребляемым кормом, предварительных данных о химико-токсикологических исследованиях, проводимых областными, республиканскими районными лабораториями, с учетом качества и безопасности кормов устанавливаемым испытательными лабораториями, расположенными в регионах, откуда поступали образцы, наличие связи - заболевание животного с потребляемым кормом, отсутствие (наличие) инфекционных, инвазионных и паразитарных болезней. Кроме того, учитывались ветеринарные обработки, а также обработка полей, посевов ядохимикатами, проводимыми агрохимической службой и т. д.

Нами исследовались: 124 пробы патматериала от различных видов сельскохозяйственных животных (телята, коровы, свиньи, рыба, индейки, цыплята-бройлеры) и 218 проб кормов, 70 проб крови, 28 проб сыворотки крови, 4 пробы спермы, 2 пробы молозива, 8 проб выделений из половых органов, 3 пробы копытцев, проведено более 900 анализов.

В результате проведенных исследований установлено, что причиной заболеваний и гибели животных в 13-ти сельскохозяйственных предприятиях РФ, является отравление микотоксинами (афлатоксин В₁, Т-2 токсин, патулин). В 20% случаев микотоксикозы протекали на фоне повышенного содержания тяжелых металлов (преимущественно кадмия, свинца и цинка), пестицидов (децис, 2, 4Д) и азотсодержащих соединений.

Даны практические рекомендации по лечению, профилактике отравлений животных и реабилитации почвы и окружающей среды по каждому выявленному случаю заболевания и гибели животных, которые способствовали ликвидации последствий воздействия экотоксикантов в короткие сроки.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ КОРМОВ ОТ МИКОТОКСИНОВ

Иванов Е. Н., Матросова Л. Е., Еремеев И. М., Тремасов Ю. М.

Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных, Казань

Корма растительного происхождения, контаминированные плесневыми грибами, представляют реальную опасность для здоровья сельскохозяйственных животных и человека-потребителя продуктов животноводства. Растительные субстраты, обсемененные токсигенными грибами, не могут быть использованы в корм без соответствующей санитарной обработки, так как микотоксины у животных могут вызывать субхронические, хронические и острые микотоксикозы.

Существующие физические и химические методы обезвреживания кормов в большинстве случаев дорогостоящие, требуют определенных производственных затрат, влияют на показатели качества кормов и не значительно снижают количество микотоксинов.

Одним из перспективных считают биологические методы (обработка кормов живыми бактериальными культурами) среди которых интерес представляют аэробные спорообразующие бактерии рода *Bacillus*, как наиболее распространенные в природе антагонисты широкого спектра патогенных микроорганизмов и грибов, которые успешно используются в различных отраслях сельского хозяйства.

В отделе токсикологии ФГУ «ФЦТРБ – ВНИВИ» на основе микроорганизма *Bacillus subtilis* – 2006, разработан препарат «Микосубтил», показавший высокую эффективность при обработке кормов, контаминированных микотоксинами. Обработка комбикормов естественно загрязненных микотоксинами препаратом «Микосубтил» позволяет снизить количество афлатоксина В₁ на 100, 0-92, 5%, Т-2 токсина на 81, 5-43, 1%. Включение в рацион животных обезвреженного препаратом «Микосубтил» корма способствует стабилизации гематологических, биохимических показателей и факторов неспецифической резистентности организма. У животных контрольных групп получавших корм содержащий микотоксины отмечалось снижение данных показателей.

Действие препарата «Микосубтил» основано на способности микроорганизмов вырабатывать ферменты, разрушающие микотоксины. Выяснено, что микроорганизм *Bacillus subtilis* – 2006 синтезирует карбоксилэстеразы и эпоксидгидролазы, трансформирующие микотоксины до менее вредных соединений. Кроме того, микроорганизм *Bacillus subtilis* – 2006 продуцирует целый ряд биологически активных веществ, повышающих устойчивость организма животных к негативному действию микотоксинов.

Таким образом, проведенные исследования показывают перспективность использования биопрепаратов на основе спорообразующих микроорганизмов в качестве средств обезвреживания кормов от микотоксинов для профилактики микотоксикозов животных.

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ Т-2 ТОКСИНА И ДИОКСИНА НА ОРГАНИЗМ КРОЛИКОВ

Кадиков И. Р., Новиков В. А., Тремасов М. Я., Папуниди К. Х.

Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных, Казань

В связи с возрастающим антропогенным воздействием на окружающую среду все чаще в кормах обнаруживаются токсиканты как природного, так и техногенного происхождения.

Среди техногенных загрязнителей большую опасность для животных и человека представляют диоксины, которые поступают в биосферу в виде микропримесей с продукцией или отходами многочисленных технологий. Диоксины - это обобщенное название большой группы полихлорированных дибензодиоксинов (ПХДД), полихлорированных дибензофуранов (ПХДФ). Наиболее токсичный из них 2, 3, 7, 8-тетрахлордибензо-пара-диоксин (2, 3, 7, 8-ТХДД), по отношению к которому часто применяется термин «диоксин».

К природным экотоксикантам относятся микотоксины, среди которых наиболее опасным для животных является Т-2 токсин, вырабатываемый грибами рода *Fusarium*.

Не исключена возможность одновременного загрязнения кормов природными и техногенными экотоксикантами. В связи с этим изучение сочетанного действия токсикантов, поиск и разработка эффективных и доступных средств для лечения и профилактики отравлений животных, вызванных микотоксинами и диоксинами, является актуальной задачей.

Исследования были проведены на 18 кроликах, которые были разделены на 3 группы по шесть животных в каждой. Животным первой группы вводили диоксин в дозе 1/200 ЛД₅₀ (0, 15 мкг/ кг живой массы), второй – Т-2 токсин – в дозе 1/20 ЛД₅₀ (0, 027 мг/кг живой массы). Третьей группе одновременно вводили диоксин и Т-2 токсин в выше указанных дозах.

Затравку животных и лечение проводили в течение 30 дней. При отравлении кроликов диоксином в течение 30 дней в дозе 1/200 ЛД₅₀ внешние признаки интоксикации не проявлялись. У животных второй группы, которым давали Т-2 токсин, клинические признаки появились на 16 день, которые характеризовались угнетением, вялостью, уменьшением потребления корма. Через 6 дней после прекращения затравки внешние признаки токсикоза исчезли.

При сочетанном отравлении диоксином и Т-2 токсином клинические признаки появились на 10 сут в виде общего угнетения, вялости, взъерошенности шерстного покрова, нарушения аппетита. В последующие дни наблюдалась диарея. В течение месяца пали все 6 кроликов; два на 14 и 15 сут, по одному на 20 и 21 сут, два – на 30 сутки.

Сочетанное воздействие диоксина в дозе 1/200 ЛД₅₀ и Т-2 токсина в дозах 1/20 ЛД₅₀ характеризуется более выраженными гематологическими и биохимическими изменениями, чем при отдельном введении токсикантов, и сопровождается снижением количества эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов на 15-16, 11-17, 15-31% соответственно, уменьшением содержания общего белка на 17-19% и изменением соотношения его фракций (снижается концентрация альбуминов на 26-35% и повышается содержание Я-глобулинов на 63-95%).

РАЗРАБОТКА СЪЕДОБНОГО ПОКРЫТИЯ С ПРОТИВОПЛЕСНЕВЫМ ЭФФЕКТОМ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ПОВЕРХНОСТИ МЯСНЫХ ДЕЛИКАТЕСОВ

Казакова Е. В., Кузнецова Л. С.

Московский государственный университет прикладной биотехнологии

Большинство пищевых продуктов, в том числе и мясные, содержащие в своем составе все необходимые для живого организма нутриенты, в процессе хранения могут претерпевать существенные изменения, в первую очередь связанные с поражением их поверхности нежелательной микрофлорой (плесенями, дрожжами и бактериями). Согласно проведенным ранее исследованиям выявлено, что основными контаминантами микробных поражений поверхности мясных продуктов выступают аскомицетные грибы порядка *Eurotiales* – мицелиальные грибы рода *Penicillium* и *Aspergillus*, обладающие высокой способностью к спорообразованию. Конидиям этих грибов свойственна не только повышенная устойчивостью к действию различных неблагоприятных факторов, но и невероятная способность к быстрому прорастанию и активному росту на поверхности белоксодержащих пищевых субстратов.

В связи с этим возникает очевидная необходимость в разработке новых, нетоксичных и эффективных средств антимикробной защиты, способных сочетать в себе не только антибактериальную, но и фунгистатическую активность. В последние годы во всем мире особое внимание уделяется созданию принципиально новых защитных съедобных пленок и покрытий, позволяющих полностью исключить утилизацию использованной упаковки и обеспечить высокое качество и безопасность готовым продуктам в течение всего периода их хранения. Однако у съедобной упаковки, безупречной с экологической точки зрения, имеется существенный недостаток: неустойчивость к действию различных микроорганизмов.

Целью представленной работы явилась разработка пленкообразующего состава для получения съедобного покрытия, обладающего выраженным фунгистатическим действием и предназначенного для защиты поверхности мясных деликатесов.

Для компетентной разработки защитного покрытия изучено влияние различных пленкообразователей и пищевых антимикробных добавок на процессы прорастания и развития главного инициатора микробной порчи поверхности мясных продуктов – плесневого гриба *Penicillium chrysogenum* ВКМ FW-3088 *P. chrysogenum*. В результате исследований разработана противоплесневая композиция, состоящая из пищевых кислот и их солей, разрешенных СанПиН 2. 3. 2. 1293-03 и не имеющих ограничений при производстве пищевой продукции. Введение разработанной модифицирующей добавки в структурную матрицу животного белка позволило получить пленкообразующий состав, обладающий противоплесневым эффектом, который получил название «Протекоут». Особый интерес представляет тот факт, что введение модификатора в белковую матрицу повышает степень переваривания белков в пищевом тракте человека в 3 раза. На разработанный пленкообразующий состав подана заявка на патент.

Съедобное покрытие «Протекоут» испытано в лабораторных и в производственных условиях. Установлено, что съедобное покрытие, сформованное на поверхности мясных деликатесов, предупреждает микробные поражения поверхности продукта, уменьшает его усушку в процессе хранения и увеличивает в 1, 5 раза срок годности упакованного продукта. Кроме того, покрытие «Протекоут» препятствует окислению липидов в поверхностном слое мясных деликатесов, что позволяет сохранить в их составе полиненасыщенные эссенциальные жирные кислоты и высокие органолептические свойства продукта.

Разработанное съедобное покрытие может быть использовано не только в мясной, но и в других отраслях пищевой промышленности, в том числе рыбной и птицеперерабатывающей.

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ДЕТЕКЦИИ АФЛАТОКСИНОВ

Калиниченко А. А.¹, Алиев Т. К.², Топорова В. А.¹, Панина А. А.¹, Крюкова Е. А.¹, Шемчукова О. Б.³, Солопова О. Н.³, Позднякова Л. П.³, Свешников П. Г.³, Долгих Д. А.¹, Кирпичников М. П.²

¹Институт биоорганической химии РАН, Москва

²Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова

³Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва

Афлатоксины, группа гепатоканцерогенов небелковой природы, обнаруживаются при поражении грибами *A. flavus* и *A. parasiticus* семян злаковых и масличных культур, орехов, сухофруктов. Токсичность различных типов афлатоксинов сильно различается. Наиболее токсичный и часто встречающийся афлатоксин В₁ отнесен к первой группе канцерогенов. Основным методом детекции афлатоксинов является иммуноферментный анализ на основе моноклональных антител. Высокая токсичность и особенности молекул афлатоксинов затрудняют получение специфичных моноклональных антител. Увеличение аффинности антител позволило бы повысить чувствительность имеющихся методов детекции и значительно уменьшить порог обнаружения афлатоксинов.

Белковая инженерия антиген-связывающего центра антител открывает хорошие перспективы получения иммуноглобулинов с улучшенными параметрами связывания. В отличие от широко используемых комбинаторных методов (фаговый, рибосомный дисплей и др.) нами был предложен новый подход к разработке алгоритма модификации антител, основанный на сравнительном анализе аминокислотной последовательности переменных доменов представительной панели моноклональных антител против афлатоксинов. Предпосылками успешной реализации данного подхода явились многолетний опыт в области получения моноклональных антител, а также разработка экспресс-метода выделения генов антител из гибридом.

Получена и детально охарактеризована панель из 10 моноклональных антител против афлатоксинов В₁, В₂ и G₂. Методами прямого, непрямого и конкурентного иммуноферментного анализа определены аффинность и кросс-реактивность этих антител. Полученные антитела позволяют с высокой чувствительностью определять как общее содержание афлатоксинов, так и концентрации отдельных типов. Проведено подробное изучение структуры генов моноклональных антител, клонированы и секвенированы переменные и константные участки. Установлено, что репертуар последовательностей легких цепей антител против афлатоксинов ограничен и фактически представлен одной последовательностью каппа-изотипа и одной лямбда-изотипа. Сделано предположение, что многообразие свойств антител достигается различием последовательностей тяжелых цепей, и, в частности, структурой третьего участка гипервариабельности (CDR3). Проведенный анализ позволяет ограничить область модификации антител единичными аминокислотными остатками данного участка, что значительно повышает вероятность получения высокоаффинных рекомбинантных антител по сравнению со стандартными комбинаторными методами.

Для осуществления в будущем сайт-направленной модификации антиген-связывающего центра нами была сконструирована и протестирована на ряде антител биотехнологическая модель биосинтеза в клетках *Escherichia coli*, выделения и функционального анализа рекомбинантных Fab'фрагментов антител. Антитела, получаемые в бактериях, полностью соответствуют по своей способности детектировать афлатоксины исходным моноклональным антителам, что позволяет их использовать в качестве оптимальной системы для тестирования эффективности подходов по увеличению аффинности антител против афлатоксинов.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОЛОГИИ ОЦЕНКИ ТОКСИНООБРАЗОВАНИЯ У МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

Кононенко Г. П., Буркин А. А.

ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН, Москва

За многие десятилетия наукой накоплен богатый опыт в изучении токсинообразования у микроскопических грибов. Знание их биосинтетических возможностей необходимо не только для дальнейшего развития фундаментальных молекулярно-генетических и эволюционных представлений, но также и для решения таких глобальных практических проблем современности как получение безопасной агропродукции. К сожалению, информация о токсинообразующих свойствах популяций грибов, жизнедеятельность которых связана с сельскохозяйственными растениями, до сих пор крайне ограничена, а доступные экспериментальные данные часто становятся предметом неверных толкований и выводов. Одной из основных причин этого является недооценка сложности данной проблемы и отсутствие единой общепринятой методологии проведения исследовательских работ.

Перед началом проектов подобного рода необходимо провести изучение компонентного состава микобиоты одного или нескольких установочных объектов, объединенных общим назначением, систематическим положением или происхождением, выделить индивидуальные культуры грибов, представляющих все многообразие исходной микобиоты, и установление их таксономической принадлежности.

Оценку токсинпродуцирующей способности культур целесообразно проводить в унифицированных условиях, что позволит использовать результаты для целей сравнения. В последние годы среди исследователей все большую поддержку получают микробиометоды, которые состоят из несложной технологии краткосрочного культивирования грибов на питательных субстратах и методов скринингового анализа микотоксинов, обеспечивающих широкие диапазоны измерения количеств. Для получения образцов грибной биомассы чаще всего используют жидкую или агаризованную среду, содержащую дрожжевой экстракт и сахарозу, и известную как YES. Для оптимизации условий выращивания грибов родов *Byssoschlamys* и *Fusarium* опробованы многие другие питательные субстраты - среда Ображея № 4, Чапека-Докса, суловый агар, картофельно-декстрозный агар и другие (Кислякова, 2000; Gagkaeva et al., 2006; Кононенко, Буркин, 2006; Буркин и др., 2007). Для дифференциации культур по интенсивности токсинообразования недавно предложен разграничительный уровень 10 мкг/мл, а также соответствующие термины – слабые продуценты (weak producers) с меньшими уровнями накопления и высоко активные продуценты (high producers), образующие количества выше этого порога (Varga et al., 2002). Соотношение числа продуцентов к общему числу изученных штаммов, которое обозначают как $n+/n$ и выражают в %, принято называть потенциалом токсинообразования у данной совокупности культур, а диапазон уровней накопления, обозначаемый как мин. - (среднее) - макс., мкг/мл – интенсивностью токсинообразования. При выявлении внутри выборки продуцентов с качественными различиями в продуктах метаболизма, может быть использован термин «характер токсинообразования».

Применение этой методологии уже позволило дать оценку способности к биосинтезу циклопиазоновой кислоты у нескольких доминирующих в составе микобиоты зерновых кормов видов *Aspergillus* (Кононенко, Буркин, 2008). Недавно проведено сравнение потенциала и интенсивности продуцирования фумонизинов группы В у представителей видов *Fusarium moniliforme* (15/15, 0, 25-(123)-1035 мкг/мл, в т. ч. высокоактивные - 7/15, 20-(260)-1035 мкг/мл), слабые - 8/15, 0, 25-(3, 1)-7, 8 мкг/мл), *Aspergillus niger* (5/14, 0, 02-(1, 0)-3, 2 мкг/мл, в т. ч. слабые - 5/5).

ЦИТРИНИН И ОХРАТОКСИН А: КОНТАМИНАЦИЯ КОРМОВ

Кононенко Г. П., Буркин А. А.,

ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН, Москва

Охратоксин А (ОА), который, кроме нефротоксического действия, обладает канцерогенной, тератогенной и мутагенной активностью, во всем мире признан приоритетным критерием контроля безопасности продовольствия и кормов. Недавно установлен факт его активного взаимодействия с другим микотоксином - цитринином (ЦИТ), которое приводит к резкому усилению патологических эффектов в биосистемах (Pfohl-Leskowicz, Manderville, 2007).

В нашей стране подробные сведения о встречаемости ОА в агропродукции получены благодаря разработке метода иммуноферментного анализа (ИФА) (Кононенко и др., 2000) и его последующего усовершенствования (Буркин и др., 2005). Возможность изучения распространенности ЦИТ с помощью ИФА появилась в 2003 г., и результаты, полученные для кормов за период по 2006 г. включительно, уже опубликованы (Буркин и др., 2006; Кононенко, Буркин, 2008). Образцы, содержащие оба токсина, были выявлены среди всех видов обследованных объектов.

В этом сообщении мы впервые представляем обобщенные данные о характере контаминации нефротоксинами ОА и ЦИТ кормового зерна, жмыхов и шротов из подсолнечника и сои, «глутена» кукурузного и комбикормов, полученные за период с 2004 по 2009 гг. Частота их встречаемости в зерне составила 8, 5, 9, 9 и 10, 5% для пшеницы (21/247), ячменя (16/162) и кукурузы (16/153), соответственно. У продукции переработки семян подсолнечника, зерна кукурузы и сои степень контаминации существенно различалась, - для жмыхов и шротов из подсолнечника составила 50, 0% (58/116), для кукурузного глутена - 54, 1% (20/37), а для соевого шрота - всего 0, 8% (1/124). В комбикормах на зерновой основе, включающих эти компоненты в разных пропорциях - 33, 5% (354/1056).

Среди положительных доля образцов, содержащих только ЦИТ, оказалась наименьшей во всех видах зерна (3/55, 2/48, 2/29), в продукции из подсолнечника (6/65) и в комбикормах (36/580), а в продуктах переработки сои и зерна кукурузы этот тип загрязненности отсутствовал. Остальные положительные образцы во всех видах объектов содержали ОА или сочетание ОА и ЦИТ.

Контаминация двумя токсинами в наибольшей мере была свойственна продукции из семян подсолнечника (37/65), а у зерна пшеницы (12/55), ячменя (4/48), кукурузы (5/29), в комбикормах (98/580) и в продукте переработки зерна кукурузы (7/20) уступала по частоте случаям контаминации ОА. При совместной загрязненности токсинами наблюдалась общая закономерность в соотношении их содержаний - уровень ЦИТ, как правило, был выше, чем ОА, совпадения или близкие значения также имели место, но были редкими. Обратное соотношение в пользу ОА, характерное для большинства образцов «глутена» (4/7), может быть вызвано частичной деструкцией ЦИТ при получении этого продукта. Оно также встречалось у единичных проб зерна пшеницы, ячменя, кукурузы и немногих образцов комбикормов (в 3-х из 98).

Три типа контаминации кормов - отдельно ОА, ЦИТ или совместно этими нефротоксинами, позволяет предположить, что их источники различны. Одним из них может быть вид *Aspergillus ochraceus* Wihelm, для нескольких представителей которого, выделенных из кормов, ранее показано слабое продуцирование ОА (Ерошкин и др., 2000). Для группы изолятов *Penicillium granulatum* Vainier, полученных из зернофуража, недавно установлена способность к активному биосинтезу ЦИТ (Васильев, Пирязева, 2009), а для одного выделенного из зерна штамма *Aspergillus alliaceus* Thom & Church - интенсивное образование ОА (Васильев и др., 2009).

ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МЯСА ОВЕЦ, ЛЕЧЕННЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОМ И БЕНТОНИТОМ ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ПОРАЖЕНИИ Т-2 ТОКСИНОМ И РАДИАЦИЕЙ

Конюхов Е. Г.

Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных, Казань

Для изучения санитарно-гигиенических качеств и биологической полноценности мяса овец при комбинированном поражении Т-2 токсином в дозе 1/5 ЛД₅₀, г-облучении малой интенсивности в дозе 2 Гр и лечении иммуноглобулином и бентонитом животных убивали на 30 сут опыта.

При внешнем осмотре установлено, что поверхность туши имела корочку подсыпания, мясо бледно-розовой окраски с красноватым оттенком, плотной, упругой консистенции. Образующаяся при надавливании ямка быстро выравнивалась. Туши хорошо обескровлены, мышцы на разрезе - блестящие, слегка влажные. Поверхность разреза лимфатических узлов сероватой или желтоватой окраски. Жир белый, мягкий, эластичный, с запахом, свойственным баранине. Сухожилия плотные, упругие, поверхность суставов гладкая, блестящая. Сваренный бульон прозрачный, ароматный.

При бактериологическом исследовании мазков - отпечатков из глубоких слоев мышечной ткани установлено, что они окрашивались слабо, в одном поле зрения обнаруживались единичные палочки и кокки.

Результаты биохимических исследований свидетельствуют о том, что рН мышечной ткани находилась в пределах нормы, содержание аминокислотного азота (ААА) опытных и контрольных животных соответствовало ГОСТу.

Реакция с медным купоросом была отрицательной, на пероксидазу - положительной. Микробная обсемененность мышечной ткани подопытных овец колебалась в пределах контрольных значений, а выделенная микрофлора относилась к стрептококкам и группе кишечной палочки.

Лизиса мышечной ткани не обнаружено: Ставили биопробу на растущих крысках — самцах по росто-весовому методу. Животным скармливали ежедневно по 4 г мясного фарша овец, леченых иммуноглобулином. Установлено, что через 28 дней после начала скармливания существенной разницы в увеличении массы крыс не отмечалось, но у животных, которые получали только безбелковый корм (3 группа), увеличение массы происходило менее интенсивно. При вскрытии крыс всех групп патологических изменений в органах не установлено. Не наблюдалось существенной разницы в массе органов у крыс: у крыс 3 группы как абсолютная, так и относительная масса селезенки в среднем была в 2, 0 раза меньше. Аналогичные изменения массы наблюдались и со стороны печени и почек (в среднем в 1, 3 раза).

Таким образом, установлено, что мясо овец, подвергнутых лечению при комбинированном поражении Т-2 токсином и гамма-облучении не имело существенных отличий от такового контрольных животных, соответствовало требованиям ГОСТов к доброкачественному мясу и имело одинаковую биологическую полноценность с мясом интактных животных.

ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ ОЦЕНКА МЯСА ОВЕЦ ПРИ СОЧЕТАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ Т-2 ТОКСИНА, КАДМИЯ ХЛОРИДА И ПРИМЕНЕНИИ ЦЕОЛИТОВ

Коростелева В. П., Папуниди Э. К.

Казанский кооперативный институт филиал РУК, КГАВМ имени Н. Э. Баумана, Казань

Опыты были проведены на 12 овцах породы «прекос», разделенные на три группы. Первая группа получала кадмия хлорид и Т-2 токсин; вторая - кадмия хлорид, Т-2 токсин на фоне цеолита (300 мг/кг); третья группа служила контролем и получала стандартный рацион. Токсины вводились внутривентриально в дозе 1/10 ЛД₅₀.

Результаты ветеринарно-санитарной экспертизы мяса опытных животных на 10-й день затравки показали, что мясо овец, всех групп имеет хорошую степень обескровливания, розово-красный цвет, упругую консистенцию, запах характерный для данного вида животных, бульон при пробе варке прозрачный, ароматный. При исследовании на 20-й и 30-й день затравки отмечалось ухудшение органолептических показателей, тогда, как в группе овец, получавших цеолит, показатели были в пределах нормы.

Физико-химические исследования показали, что мясо подопытных овец, получавших с кормом сочетание Т-2 токсин и кадмия хлорид, имеет отклонения от нормы, причем прослеживалась тенденция их ухудшения в зависимости от сроков затравки. Так, на 10-й день затравки рН составил 6, 2 на 20-й - 7, 0 на 30-й день - 7, 2; при реакции на фермент пероксидазу окраска появлялась с опозданием, а на 20-й и 30-й окраска не появлялась; коэффициент кислотности-окисляемости 0, 24, на 20-й - 0, 2 и 30-й день 0, 17, что говорит о незначительной титруемой кислотности, накоплении банальной микрофлоры и наличие первичных продуктов распада органических веществ; формольная реакция характеризовалась, выраженной желеобразной консистенцией.

Физико-химические показатели мяса животных, получавших токсиканты на фоне цеолита, соответствовали нормам, предусмотренным стандартом: рН 5, 8-6; при реакции на пероксидазу появляется сине-зеленое окраши-

вание, переходящее в бурое; при формольной реакции фильтрат остается прозрачным; коэффициент кислотности-окисляемости составлял не менее 0, 4.

Таким образом, можно сделать заключение, что мясо животных, получавших сочетано кадмий, Т-2 токсин на фоне цеолита, имеет органолептические и физико-химические показатели, соответствующие стандартам, предусмотренным для мяса здоровых животных. Нормализацию показателей мяса можно объяснить снижением накопления тяжелых металлов в органах и тканях и крови животных, улучшением резистентности организма и обменных процессов.

СЪЕДОБНЫЕ ГРИБЫ КАК АЛИМЕНТАРНЫЙ ИСТОЧНИК НЕКОТОРЫХ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И МЫШЬЯКА

Костычев А. А.

РЦГЭКиМ по Пензенской области, Пенза

Одной из важнейших экологических проблем современности является проблема загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами. Среди живых организмов, населяющих природные экосистемы суши, способностью к биоаккумуляции тяжелых металлов обладают базидиальные макромицеты. Поэтому оценка безопасности дикорастущей грибной продукции представляется весьма актуальной.

Объектами наших исследований стали съедобные виды агарикоидных и гастероидных базидиомицетов. Сбор образцов базидиом осуществлялся на территории Пензенской области в лесных экосистемах, сформированных на серых лесных почвах, не испытывающих существенного техногенного загрязнения. Анализ образцов плодовых тел осуществлялся рентгенофлуоресцентным методом на спектрометре с волновой дисперсией «Спектроскан Макс-GF1E». Проанализированы образцы базидиом 54 видов съедобных грибов.

Из изученных химических элементов в плодовых телах съедобных грибов в РФ официально нормируется содержание свинца, цинка и мышьяка. В соответствии с требованиями СанПиН 2.3.2.560-96 установлены следующие предельно допустимые уровни содержания элементов: свинца – 0, 5 мг/кг сырой массы, цинка – 20 мг/кг, мышьяка – 0, 5 мг/кг. Согласно требованиям нормативных документов объединенного комитета экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам и контаминантам предельно допустимое содержание свинца составляет 0, 3 мг/кг сырой массы, мышьяка – 1, 0 мг/кг.

Установлено, что некоторые базидиомицеты, развиваясь даже в условиях незагрязненных экосистем, накапливают в своих плодовых телах элементы в концентрациях, превышающих установленные лимиты. Так, содержание свинца в плодовых телах *Boletus luridus*, *Lactarius quietus*, *Lycoperdon perlatum*, *Macrolepiota procera* и *Calvatia utriformis* превышало предельно допустимый уровень. Более жесткие требования в отношении содержания этого элемента в плодовых телах съедобных грибов, установленные объединенным комитетом экспертов ФАО/ВОЗ, были превышены в базидиомах *Boletus erythropus*, *Cortinarius triumphans*, *Flammulina velutipes*, *Leccinum duriusculum*, *L. holopus*, *L. scabrum*, *Lepista nebularis*, *L. nuda*, *Russula cyanoxantha*, *R. pseudointegra*, *Suillus granulatus*, *Xerocomus badius*.

Превышение установленного предельно допустимого уровня содержания мышьяка было отмечено в базидиомах *Lactarius deliciosus*, *Lepista nuda*, *Lycoperdon perlatum*, *Tricholoma imbricatum*. В концентрациях, превышающих максимально допустимое содержание, установленное объединенным комитетом экспертов ФАО/ВОЗ, накапливали мышьяк *Gyroporus castaneus*, *Leccinum holopus*, *Macrolepiota procera*, *Suillus bovinus*, *Tricholoma populinum*.

Тот факт, что в плодовых телах многих съедобных грибов названные элементы накапливаются в концентрациях, превышающих лимиты, позволяет рассматривать данный вид пищевой продукции как один из основных источников поступления тяжелых металлов и мышьяка в организм человека. Однако, в настоящее время абсолютно объективно оценить риск поступления тяжелых металлов и мышьяка с плодовыми телами съедобных грибов не представляется возможным ввиду ограниченности и противоречивости сведений об их биологической доступности и усвояемости человеческим организмом. Необходимость всесторонних исследований усвояемости и доступности токсичных элементов, поступающих в организм человека с плодовыми телами грибов диктуется еще и тем, что на сегодняшний день в отечественных санитарных правилах и нормативах допустимые уровни содержания токсичных элементов едины для продуктов, происхождение которых существенно отличается: овощи, фрукты, ягоды, бахчевые, грибы.

ТОКСИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ ФИЛЬТРАТА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ГРИБОВ РОДА FUSARIUM НА СЕМЕНА ПШЕНИЦЫ

Кутлубердина Д. Р., Хайруллин Р. М.

Башкирский государственный аграрный университет, Уфа

Целью работы являлось определение фитотоксической активности распространенных на территории республики Башкортостан видов грибов р. *Fusarium* по отношению к яровой пшеницы сорта Казахстанская 10. Материалом для исследования служили изоляты *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, составля-

ющие основу фузариозного патогенного комплекса на пшенице в Республике Башкортостан. Грибы культивировали на жидкой питательной среде Чапека в течение 7 суток при 25 °С в колбах объемом 1 литр на шейкерах-инкубаторах BIOSAN ES-20 (метод погруженного культивирования). Фитотоксическое действие культуральной жидкости (КЖ) изолятов после фильтрования ее через мембраны (22 мкм) определяли, проращивая семена пшеницы на среде с фильтратом в течение 5-ти суток в темноте при температуре 20° С.

Так, нами было установлено, что грибы р. *Fusarium* при культивировании на жидкой среде выделяют вещества, в той или иной степени ингибирующие прорастание семян пшеницы, угнетающие развитие корневой системы и стебля проростков. Достоверное снижение всхожести семян наблюдалось только в вариантах с неразбавленным культуральным фильтратом (КФ) всех 4 грибов. Наибольшим эффектом обладали *F. sporotrichioides*, ингибируя всхожесть семян на 35% по сравнению с контролем. Ингибирующее действие других грибов оказалось менее выраженным. При разбавлении фильтрата (1 объем фильтрата+1 объем воды) наблюдалось закономерное увеличение всхожести семян. При обработке фильтратом *F. avenaceum*, длина корней снижалась в 3 раза, а при использовании меньшей концентрации – в 2 раза по сравнению с контролем. Аналогичная картина наблюдалась и при действии фильтрата гриба на колеоптили проростков. *F. graminearum* оказал более сильное токсическое действие на корни и подавлял их развитие в большей степени, по сравнению с *F. avenaceum*. При этом эффект, оказываемый этим патогеном на колеоптили проростков, проявился в слабой степени. При действии токсинов *F. poae* наибольший эффект наблюдался при действии неразведенной КЖ на корни проростков. Длина корней уменьшалась в 4 раза по сравнению с контролем. Однако при разбавлении фильтрата токсический эффект данного фитопатогена значительно снижался. Что касается колеоптилей, ни концентрированный, ни разбавленный фильтрат заметно не угнетал развитие последних. Токсическое действие *F. sporotrichioides* оказалось максимальным среди всех исследованных фитопатогенов р. *Fusarium*. Рост корней на неразведенной КЖ снижался почти в 4 раза, а колеоптилей – в 2 раза по сравнению с контролем. Даже при разбавлении КФ сохранялся выраженный токсический эффект гриба. Несмотря на то, что *F. sporotrichioides* и *F. poae* являются представителями секции *Sporotrichiella*, эти виды сильно различаются по токсичности.

Ростингибирующая активность КЖ исследуемых грибов, вероятнее всего, связана с присутствием в фильтрате фитотоксинов, продуцируемых данными патогенами. Известно, что способность продуцировать те или иные токсины является видоспецифичной. По нашим данным, наибольшим токсическим действием обладал КФ *F. sporotrichioides*. Это может быть связано с тем, что Т-2 токсин, синтезируемый этим фитопатогеном, является наиболее токсичным по отношению к растениям пшеницы по сравнению с токсинами, продуцируемыми другими исследованными грибами. КФ *F. graminearum* также проявил высокую степень фитотоксичности. Показанное нами фитотоксическое действие культуральных фильтратов различных представителей р. *Fusarium* согласуется с данными ранее проведенных исследований других авторов. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что изученные виды р. *Fusarium* обладают различной фитотоксической активностью. При культивировании на жидкой среде они выделяют вещества, в той или иной степени ингибирующие прорастание семян пшеницы, угнетающие развитие корневой системы и стебля проростков.

АСПЕРГИЛЛЫ КАК ПРЕДСТАВИТЕЛИ МИКОБИОТЫ КОНДИТЕРСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Леонова И. Б., Озерская С. М., Иванушкина Н. Е., Жарикова Г. Г.

Российская экономическая академия имени Г. В. Плеханова, Москва

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г. К. Скрыбина РАН, Пущино

Результаты исследований микобиоты сахаристых кондитерских изделий показывают, что 30-40% представителей плесневых грибов, выявляемых из этой группы пищевых продуктов, принадлежат к роду *Aspergillus*. В лаборатории микробиологии пищевых продуктов РЭА имени Г. В. Плеханова в процессе изучения микофлоры шоколада и шоколадных конфет, выделены наиболее распространенные представители мицелиальных грибов.

При всем многообразии мицелиальных грибов традиционными представителями микобиоты сахаросодержащих кондитерских изделий является достаточно ограниченный круг. Естественно, постоянно встречаются различные одиночные представители «экзотической» микобиоты, но перечень часто встречающихся видов достаточно постоянен год от года.

Аспергиллы являются постоянными обитателями окружающей внешней среды и их присутствие в пищевых продуктах закономерно. Данная работа посвящена изучению качественного состава мицелиальных грибов, относящихся к роду *Aspergillus*, выделенных из шоколада и шоколадных конфет. Видовую идентификацию плесневых грибов проводили на основании культурально - морфологических признаков, в соответствии с рекомендациями современных определителей.

Наиболее распространенными представителями аспергиллов являются *A. flavus* и *A. niger*. Систематически выделяемые штаммы этих грибов различаются по отдельным культуральным признакам, таким как окраска и текстура воздушного и субстратного мицелия, интенсивность спорообразования.

Кроме того, распространенными представителями микобиоты кондитерских изделий являются *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. candidus* и *A. versicolor*.

Согласно принятым в 2008 году новым санитарно-эпидемиологическим правилам (Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.3.2322-08. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. М.: Госкомсанэпиднадзор РФ, 2008.) 3 вида рода *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*) относятся к 3 группе патогенности, все остальные виды – к 4 группе патогенности. Таким образом, список значительно расширился, поскольку в предыдущей редакции Правил только 4 вида были упомянуты как патогенные (*A. flavus*, *A. fumigatus* – 3 группа, *A. niger*, *A. nidulans* – 4 группа). Увеличение списка видов патогенных грибов связано с резким возрастанием в последние годы числа агентов микотических инфекций, среди которых важную роль играют представители рода *Aspergillus*.

Присутствие патогенных и условно патогенных аспергиллов в кондитерских изделиях является фактором, нарушающим условия формирования безопасности пищевых продуктов по микробиологическим критериям. Аспергиллы, являясь одними из основных микоконтаминантов кондитерских изделий, считаются потенциальными токсинообразователями, способными изменять природное микробное равновесие в доброкачественных товарах и вызывать различные нарушения макроорганизма на фоне ослабленного иммунитета современного потребителя. Поэтому определение качественного состава микобиоты и его нормирование является одной из важных проблем пищевой микробиологии.

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФУМОНИЗИНОВ ГРУППЫ В КАК МОДУЛЯТОРОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО СТАТУСА КЛЕТКИ

Мартынова Е. А.

Научно-исследовательский институт питания РАМН, Москва

На предыдущем микологическом конгрессе мы обнародовали новые приоритетные данные, касающиеся регуляции энергетического статуса клетки микотоксином фумонизином В1. Представляемая работа является продолжением данной темы и посвящена сравнительному анализу двух микотоксинов группы В – фумонизина В1 (FB1) и фумонизина В2 (FB2), продуцируемых микроскопическими плесневыми грибами рода *Fusarium moniliforme, proliferatum* и другими родственными видами. В клетках млекопитающих сигнальные пути от нутриентов, АТФ, рецепторов инсулина и транспортеров глюкозы регулируются киназой mTOR (mammalian Target of Rapamycin), которая формирует два мультипротеиновых комплекса. В ответ на ростовые факторы комплекс mTORC2 фосфорилирует протеинкиназу В/Akt, необходимую для выживания клеток. Сигналы от нутриентов передаются на первый комплекс mTORC1, который регулирует клеточный цикл и пролиферацию за счет фосфорилирования рибосомальной киназы p70 S6K1 и регулятора фактора транскрипции 4E-BP1. Одновременно комплекс mTORC1 ингибирует процессы микроаутофагии – системы, отвечающей за обновление белков в клетке. Целью работы было сравнение влияния фумонизинов В1 и В2 на экспрессию белков первого и второго комплексов киназы mTOR, передачи сигналов, связанных с пролиферацией клеток и с апоптозом, а также установление взаимосвязи этих показателей с уровнем клеточного дыхания.

Материалы и методы. Работа проведена на мышах линии СВА и С57В16, которым фумонизины В1 и В2 вводились i. p. однократно или многократно в дозах от 0,05 до 2 мкг/г веса тела. Экспрессию белков определяли с помощью моноклональных антител, уровень ДНК в клетках определяли по окраске пропидиумом иодидом на проточном цитометре FACSCalibur (Beckton Dickinson, USA) по программе Cell Quest.

Результаты. Было установлено, что действие обоих фумонизин является органоспецифичным, наиболее выраженные изменения касаются печени и тимуса животных. Показано достоверное различие в действии фумонизинов В1 и В2 на белки комплексов mTORC1 и mTORC2. Фумонизин В2 вызывает более выраженные изменения по сравнению с фумонизином В1, при этом эффекты обоих токсинов носят бимодальный характер. Изменение экспрессии киназы mTOR сопряжено со снижением уровня ДНК в клетках, ингибированием пролиферации и остановкой клеточного цикла в G2 фазе. Одновременно изменяется экспрессия белков семейства Bcl, а именно, дозо-зависимо снижается экспрессия Bcl-x и возрастает экспрессия белка Bcl-2. Высокие дозы фумонизинов В1 и В2 (i 50 мкг на мыш) обуславливают резкое снижение уровня АТФ в клетке, снижение активности белков первого комплекса mTORC1, повышение активности стрессовых белков HSP70, HSP60 и снижение экспрессии белка HSP90. Одновременно с изменением экспрессии белков комплексов mTORC1 и mTORC2 активируют процессы аутофагии и апоптоза. Аутофагия определялась по экспрессии белков беклина В1 и atg5. Было установлено, что активация аутофагии определяется изменением экспрессии белков комплекса mTORC2. Действие фумонизина В2 на активацию аутофагии в несколько раз более выражено по сравнению с фумонизином В1, введенным в тех же дозах и условиях эксперимента.

Выводы. Фумонизины группы В (В1 и В2) в дозах 0,05 – 2 мкг на 1 г веса мышей оказывают бимодальное действие на экспрессию белков, входящих в комплексы, формируемые энергозависимой киназой mTOR. Фумонизин В2 проявляет большую активность по сравнению с фумонизином В1. Действие обоих токсинов органоспецифично, максимальные изменения обнаружены в печени и тимусе животных. Снижение уровня mTOR коррелирует с угнетением клеточного дыхания, с активацией АТФ-зависимых ферментов, снижением уровня ДНК и ингибированием пролиферации клеток. Активация аутофагии связана с изменением экспрессии белков, входящих в комплекс mTORC2. Фумонизин В2 в несколько раз более активен по сравнению с FB1 в процессах активации аутофагии.

ОРГАНОТРОПНАЯ ОЦЕНКА СОЧЕТАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ Т-2 И афлатоксина В₁ **Матвеева Е. Л., Степанов В. И.**

Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных, Казань

Для патоморфологических исследований смешанных микотоксикозов были проведены опыты на лабораторных белых крысах и овцах. Первая группа подопытных животных получала растворы Т-2 токсина и афлатоксина В₁, вторая - раствор Т-2 токсина, третья - раствор афлатоксина, в дозах 1/10 ЛД₅₀. Четвертая группа служила контролем, которая получала аналогичный объем растворителя. Наблюдение велось в течение 30 суток.

Патматериал фиксировали в 10%-ном нейтральном растворе формалина (Меркулов Г. А., 1969). Обезвоживание и заливку проводили по схеме Волковой-Елецкого (Саркисов Д. А., Перов Ю. Л., 1996). Для изучения общей гистоморфологической картины окраску срезов проводили гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону.

Для изучения действия микотоксинов на ультраструктуру клеток кусочки органов фиксировали в 2-4%-ных растворах глутаральдегида в фосфатном буфере с рН 7, 3-7, 4, постфиксировали в 1%-ном растворе тетраоксида осмия.

Срезы для электронной микроскопии изготавливались на ультрамикротоме ЛКВ-111. Ультратонкие срезы контрастировали растворами уранилацетата и цитрата свинца по Рейнольдсу и просматривали в электронном микроскопе ПЭМ-100.

Гистологические исследования при острой и хронической интоксикации сочетанным поступлением Т-2 токсина и афлатоксина В₁ в дозах 1/10 ЛД₅₀ показали дистрофию эпителия слизистой оболочки желудка и тонкого отдела кишечника, местами вплоть до десквамации. Печень находилась в состоянии дистрофии. Гепатоциты претерпевали явления пикноза и рексиса ядерного вещества и цитоплазмы. Нефротоксический эффект проявлялся в структурах коркового вещества, особенно в канальцах проксимального отдела нефронов. Изменения в селезенке отражали нарастающую эритро-, лимфоцито- и тромбоцитопению. Миокард выделялся отеком стромы и наличием мелкоочаговых кровоизлияний.

Анализ полученных нами результатов электронно-микроскопических исследований свидетельствовал о глубоких ультраструктурных изменениях в органоидах и цитоплазме клеток. В гепатоцитах печени наблюдали выраженное уменьшение количества органоидов и их разрушение. Кариолема имела извилистую форму, ее целостность была местами нарушена, поровые комплексы выделялись нечетко. Хроматин ядерного вещества резко уплотнен и занимал большую часть среза ядра. В цитоплазме вследствие полного разрушения органоидов возникали зоны деструкции. По мере нарастания тяжести дистрофических изменений увеличивалась электронная плотность цитоплазмы клеток селезенки, уменьшалось их количество по сравнению с таковыми контрольной группы. Действие микотоксинов вызвали резкое набухание митохондрий, разобщение крист и просветление матрикса. Наблюдалось расширение канальцев эндоплазматической сети и цистерн пластинчатого комплекса. В клетках головного мозга степень изменений ультраструктуры нейронов, глиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров колебалась в больших пределах. В коре больших полушарий у нейронов отмечена перегруппировка хроматина, множественные локальные расширения перинуклеарного пространства. В митохондриях выявлена фрагментация наружной, внутренней или даже обеих мембран, сопровождавшаяся появлением миэлиноподобных телец в матриксе митохондрий.

Таким образом, гистологические и ультраструктурные изменения органов и тканей подопытных животных при острой и хронической интоксикации сочетанным поступлением Т-2 токсина и афлатоксина В₁ в дозах 1/10 ЛД₅₀ характеризовались выраженным синергетическим повреждающим действием данных микотоксинов без проявления внешних симптомов отравления.

ПРОБИОТИК НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ МИКОТОКСИКОЗА

Матросова Л. Е., Шамилова Т. А., Тремасов Ю. М.

Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных, Казань

В последние годы проблема микотоксинов стоит особенно остро. Их широкое распространение в природе наносит существенный ущерб животноводству: микотоксины вызывают нарушения обменных процессов, понижают иммунитет, повышают восприимчивость к инфекционным болезням. Чтобы добиться максимальной защиты от микотоксинов, минимизировать результат пагубного воздействия на организм животного, необходима разработка и внедрение в практику новых препаратов. В настоящее время для профилактики микотоксикозов успешно применяются пробиотические препараты.

Профилактическую эффективность пробиотика Энтероспорин при Т-2 токсикозе изучали в опытах на 20 поросятах 2 месячного возраста, разделенных по принципу аналогов на 2 группы (n=10). В кормах, используемых для рациона поросят, выявлен токсигенный штамм гриба *Fusarium sporotrichiella*, продуцирующей Т-2 токсин в количестве 0, 3±0, 03 мг/кг. Первая группа служила контролем и получала корм, контаминированный Т-2 токсином; вторая группы животных получала этот же корм, но с добавлением пробиотика Энтероспорин в дозе 5 мл (2 млрд. микр. кл. в 1 мл) один раз в сутки в течение 30 дней.

В результате проведенных исследований подтверждена высокая профилактическая эффективность пробиотика Энтероспорин при спонтанном Т-2 токсикозе животных.

У животных контрольной группы, получавших корм, содержащий Т-2 токсин, проявлялись явные признаки токсикоза. Отмечалось снижение массы тела на 33, 4 % ($P < 0, 01$). На 10, 20 и 30 сутки уменьшение содержания эритроцитов и лейкоцитов в крови животных контрольных групп составило 18, 3 ($P < 0, 05$); 31, 5 ($P < 0 \pm 01$); 39, 7 ($P < 0, 01$) и 23, 4; 29, 3 и 39, 8 % ($P < 0, 01$) соответственно. Содержание гемоглобина в крови животных первой группы к концу эксперимента снизилось на 38, 7% ($P < 0, 001$). Под влиянием Т-2 токсина отмечалось угнетение факторов неспецифической резистентности организма: отмечалось снижение фагоцитарной активности, фагоцитарного индекса, активности лизоцима, содержание Т и В лимфоцитов.

Под влиянием Энтероспорина нормализовались клинические, гематологические и биохимические показатели. Введение в рацион поросят пробиотика снижало негативное влияние Т-2 токсина на прирост живой массы. Клиническая картина интоксикации была менее выражена и проявлялась в более поздние сроки. Статистически достоверной разницы в изменениях гематологических показателей у животных, получавших корм, содержащий Т-2 токсин и пробиотик Энтероспорин, не обнаружено.

Применение Энтероспорина способствовало стабилизации показателей неспецифической резистентности организма. Так фагоцитарная активность, фагоцитарный индекс и активность лизоцима увеличивались в среднем на $29, 2 \pm 1, 5\%$ ($P < 0, 01$), $42, 6 \pm 2, 8\%$ ($P < 0, 001$), $8, 4 \pm 3, 2\%$. Под действием Энтероспорина восстанавливалось количество Т и В лимфоцитов.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о положительных тенденциях в состоянии организма после применения в качестве профилактического средства при Т-2 токсикозе пробиотика Энтероспорин.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАРАЖЕННОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЗЕРНА ПЛЕСНЕВЫМИ ГРИБАМИ - ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ ПРОДУЦЕНТАМИ ТРИХОТЕЦЕНОВЫХ ТОКСИНОВ

Минаева Л. П., Григорьев А. М., Шевелева С. А.

НИИ питания РАМН, Москва

Целью работы было исследование состава микофлоры образцов зерна, которые одновременно контролировались на содержание микотоксинов в рамках мониторинга загрязнения продовольственного сырья и пищевых продуктов, проводимого в НИИ питания РАМН. Наиболее часто обнаруживаемыми в зерне являются микотоксины, грибов рода *Fusarium*, среди которых токсическими свойствами и широкой распространенностью выделяются дезоксиниваленон (ДОН), зеараленон (ЗЛ) и фумонизины ($ФВ_1$ и $ФВ_2$), Т-2 и НТ-2 токсины. В различных зарубежных и отечественных публикациях отмечается, что токсин Т-2 является самым токсичным среди трихотеценовых микотоксинов и представляет реальную опасность для здоровья человека.

В рамках проводимой работы исследовали образцы продовольственного зерна пшеницы, ячменя, ржи и кукурузы урожая 2006-2008 гг., полученные из Южного, Дальневосточного, Центрального, Приволжского, Сибирского Федеральных округов РФ. Из 25 образцов зерна, проанализированных нами, 11 не содержали остаточных количеств микотоксинов, а 14 имели разную степень загрязнения микотоксинами Т-2 и НТ-2, ДОН и ЗЛ. При этом уровни микотоксинов, установленные методом ВЭЖХ во всех случаях были ниже регламентируемых допустимых показателей.

Внутреннюю микофлору зерна выделяли после дезинфекции внешней поверхности, полученные изоляты грибов пересеивали на картофельно-глюкозный агар и идентифицировали традиционными методами по совокупности культуральных и морфологических признаков.

Микроскопические плесневые грибы, характерной родовой принадлежности обнаруживались во внутреннем содержимом всех видов зерна с частотой от 29, 9 до 62, 9%. Наиболее высокой зараженностью была в зерне овса (2/3 выборки), менее высокой – ячменя (1/3). Уровни содержания плесеней во всех видах зерна при этом являлись невысокими, составляя в среднем величины одного порядка $43, 4 \pm 7, 1$ КИ/г (количество изолятов в 1 г зерна). Показано, что в совокупной микофлоре изученных образцов зерна преобладающей являлась популяция грибов рода *Fusarium* (22% от общего числа культур при удельном весе других родов и групп в пределах 1, 9 – 16, 9%). Медианные значения зараженности *Fusarium spp* 4-х видов зерна укладывались в диапазон $2 \times 10^5, 5$, *Aspergillus spp* – $0 \times 10^5, 3$, *Penicillium spp* – $0 \times 10^2, 6$ КИ/г. Наибольший уровень *Fusarium spp* обнаруживался в составе грибных популяций овса (25, 7%) и пшеницы (22, 8%).

Зависимости в показателях частоты обнаружения и уровней содержания плесеней р. *Fusarium* во всех образцах зерна от наличия или отсутствия в них загрязнения микотоксинами не было отмечено.

При идентификации видовой принадлежности грибов выделенных из образцов зерна, содержащих Т-2 и НТ-2 токсины, было характерным присутствие грибов рода *Fusarium* вида *oxysporum*. Наиболее контаминированный образец пшеницы, в котором был обнаружен НТ-2 токсин и повышенный уровень ДОН, оказался заражен единственным видом - *F. oxysporum*. Кроме того из исследованных образцов были выделены *F. graminearum* и *F. semitectum (incarnatum)*.

В настоящее время продолжают исследования по видовой идентификации грибов рода *Fusarium* в образцах продовольственного зерна. Использование при этом традиционных методов требует больших затрат времени и труда, наиболее перспективным будет применение новых методов идентификации, основанных на ПЦР в реальном времени с использованием специфических праймеров.

МОНИТОРИНГ ГРИБНЫХ ОТРАВЛЕНИЙ НА ТЕРРИТОРИИ АРМЕНИИ И ВОЗМОЖНЫЕ МЕРЫ ПО ИХ ПРЕДОТВРАЩЕНИЮ

Нанагюлян С. Г., Бабаян М. Ю., Маркарян Л. В., Гаспарян А. А.

Ереванский государственный университет

Государственная гигиеническая и противозидемическая инспекция МЗ Республики Армения, Ереван

На территории Армении отмечено более 1200 видов макроскопических грибов, среди которых около 300 видов относятся к съедобным. Многолетний анализ данных, а также опрос сельского и городского населения Армении показал, что реально в пищу широко используются только 15-20 дикорастущих видов грибов. Наиболее распространенными являются съедобные виды *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus campestris*, *Calocybe gambosa*, *Cantharellus cibarius*, *Suillus granulatus*, *Lepista personata* и др. Вместе с тем, сбор и продажа дикорастущих грибов не контролируются, результатом чего являются периодические отравления по всей территории Армении. Отметим также отсутствие культуры сбора и использования грибов. Как известно, не только ядовитые виды грибов могут стать причиной отравления, но и съедобные грибы, растущие на местностях, загрязненных тяжелыми металлами и разными токсическими веществами. К сожалению, до сих пор населением для определения съедобности грибов применимы такие народные приметы как использование серебра, чеснока или лука.

Наряду со съедобными грибами, в Армении зарегистрировано около 60 ядовитых видов, потенциально опасных для здоровья человека. Ядовитые свойства и характер отравления зависят от химического состава и механизма действия конкретного токсина грибов. Наиболее распространенными ядовитыми видами являются некоторые представители родов *Inocybe*, *Amanita*, *Clitocybe*, *Tricholoma*, *Entoloma*, *Cortinarius* и др.

С целью мониторинга грибных отравлений нами проведена статистическая обработка данных последних пяти лет, а также выявлено территориальное распределение отравлений по регионам Армении. По материалам государственной гигиенической и противозидемической инспекции Минздрава РА на 01. 02. 2010, в течение 2005-2009 гг. по всей территории Армении было зарегистрировано 167 случаев отравления грибами, из которых 18 - в городе Ереване. Из регионов пик грибных отравлений отмечен в Лорийском регионе. Из 62 случаев отравлений грибами в 2006г. на долю Лори приходится 30. Аналогичная неблагоприятная ситуация отмечена в указанном регионе и в последующие годы. Неоднократные отравления дикорастущим видом съедобного гриба вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) были отмечены в этом регионе в последние годы. Тщательное исследование показало, что именно в период сбора грибов были проведены плановые обработки лесов химикатами. По-видимому, именно это и послужило причиной не тяжелых, но все-таки отравлений.

От грибных отравлений с 2005 по 2009 гг. пострадали 295 человек, из которых в 43 случаях были дети до 14 лет. В 2006 и 2007 годах отмечены соответственно 7 и 2 случая со смертельным исходом. Выведение из организма грибного токсина является основным направлением в лечении пострадавших. При отравлениях особенно важно оказание первой медицинской помощи и срочная госпитализация больных для интенсивного лечения.

Обобщая вышесказанное, отметим, что только путем повышения уровня знаний населения о грибах, можно уменьшить количество отравлений грибами. В проведении различных разъяснительных мероприятий среди населения, в общеобразовательных учреждениях и среди медицинского персонала, особенно нуждаются регионы страны. Необходимо проведение лицензирования грибников и обязательных проверок качества грибных продуктов, выставляемых на прилавки рынков и магазинов.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ПОЛНОЦЕННОСТЬ МЯСА ОВЕЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ Т-2 ТОКСИНА НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Папунди Э. К., Тарасова Е. Ю.

КГАВМ имени Н. Э. Баумана, Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных, Казань

С целью определения биологической полноценности мяса овец было отобрано 30 крысят-самцов (различия в массе тела не превышали 10 г), разделенных по принципу-аналогов на 5 групп. В опытный период дополнительно к основному рациону крысята получали ежедневно по 10 г вареного мяса овец на голову в течение 28 суток.

Первая группа крысят, получала мясо овец, подвергшихся воздействию Т-2 токсина в дозе ЛД₅₀, вторая группа - в дозе 1/5 ЛД₅₀, третья и четвертая группы получали мясо овец, подвергшихся воздействию Т-2 токсина в дозах ЛД₅₀ и 1/5 ЛД₅₀ соответственно на фоне применения лекарственных средств, пятая группа крысят получала мясо интактных овец.

В течение срока эксперимента за животными всех групп велись клинические наблюдения. Взвешивания крысят осуществлялось на 5, 10, 15, 20, 28 сутки.

Биологическую полноценность мяса овец определяли по приросту массы тела крысят контрольной и опытной групп и по коэффициенту эффективности корма (КЭК).

Прирост массы тела у крысят опытных групп происходил практически с той же закономерностью, что и у крысят контрольной группы. В течение периода наблюдения животные всех групп были активны, признаки интоксикации не выявлены.

Коэффициент эффективности корма в первой группе составил 30, 59%, во второй группе - 30, 69%, в третьей группе - 31, 52%, в четвертой группе - 33, 40%, в пятой группе - 32, 79%.

Таким образом, достоверных отличий после расчета коэффициента эффективности корма у крысят, получавших мясо овец после воздействия Т-2 токсина и на фоне применения лекарственных средств, по сравнению с контрольной группой не наблюдалось.

Проведенный эксперимент показал, что мясо, полученное от животных, подвергшихся воздействию Т-2 токсина в дозах $1/5$ ЛД₅₀ и ЛД₅₀, а также после применения на фоне интоксикации Т-2 токсином в этих дозах лекарственных средств, по таким показателям как прирост массы тела и коэффициент эффективности корма, не имело существенных отличий от мяса здоровых животных.

МИКРОМИЦЕТЫ И ИХ ТОКСИНЫ В ЗЕРНЕ КУКУРУЗЫ

Русанов В. А.^{1, 2}, Фетисов Л. Н.², Солдатенко Н. А.², Сухих Е. А.².

1 Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону

2 Северо-Кавказский зональный НИВИ, Новочеркасск

На юге России кукуруза является важной составной частью рационов сельскохозяйственных животных и птицы. Важнейшим показателем санитарного качества кормов считается пораженность их грибами родов *Aspergillus* и *Fusarium*, многие виды которых продуцируют опасные микотоксины, способные в числе прочего подавлять иммунитет у животных и птицы. Так, афлатоксин угнетает фагоцитарные способности нейтрофилов и моноцитов а также подавляет способность организма птиц поднимать и удерживать повышенной температуру тела, что важно как фактор естественной устойчивости при заражении сальмонеллами и эшерихиями. Трихотецены подавляют клеточный иммунный ответ, непосредственно влияя на местный иммунитет в кишечнике, костный мозг, селезенку, лимфоидные ткани, тимус, поражая активно делящиеся клетки.

В последние годы на юге России получили распространение позднеспелые сорта кукурузы, сроки уборки которых совпадают с повышением риска выпадения осадков и значительного повышения влажности воздуха, что способствует контаминации грибами и плесневению зерна, накоплению в нем микотоксинов.

Представлены результаты микологического мониторинга грибов родов *Aspergillus* и *Fusarium* и их микотоксинов (метод ИФА, Ерощкин и др, 2002) в 87 образцах зерна кукурузы из хозяйств Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краев.

Видовой состав грибов рода *Aspergillus*: *A. ochraceus* (25% положительных проб), *A. ustus* (13%), *A. niger*, *A. cadidus*, *A. repens* (по 11%); *A. ornatus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. pulverulentus* (по 4%). Грибы рода *Fusarium* выделены из 60% образцов: *F. graminearum* (37%), *F. sporotrichioides* (12%), *F. oxysporum* var. *oxysporum* (7%), *F. solani* (7%).

Охратоксин А1 отмечен в 40% образцов комбикормов, в состав которых входит кукуруза. Отмечена положительная многолетняя динамика присутствия в образцах зерна кукурузы афлатоксина В1, охратоксина А1 и фумонизина В₁ (в последнем случае наблюдали возрастание числа проб выше МДУ в 3 раза).

ВЫЯВЛЕНИЕ МИКОТОКСИНОВ ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛ И ЗЕАРАЛЕНОН В КОНТАМИНИРОВАННОМ ЗЕРНЕ МЕТОДОМ ИФА

Рыстаева Р. А., Орынбаев М. Б., Мамадалиев С. М.

НИИ проблем биологической безопасности, п. Гвардейский, Казахстан

К природным контаминантам продовольственного сырья и пищевых продуктов, представляющих реальную опасность для здоровья человека и животных относятся микотоксины, что связано с их высокой токсичностью, наличием у большинства из них иммунодепрессивных, канцерогенных свойств. Среди них наиболее часто обнаруживаемыми являются микотоксины, продуцируемые грибами рода *Fusarium*. В отличие от других микотоксинов, фузариотоксины накапливаются в зерне колосовых культур, пораженных фузариозом колоса в период созревания, и интенсивность их синтеза зависит в значительной степени от климатических и погодных условий.

На сегодняшний день для контроля микотоксинов используют различные методы. Наиболее известные и распространенные из них - тонкослойная и высокоэффективная жидкостная хроматография (ТСХ и ВЭЖХ). Недостаток ТСХ в том, что это полуколичественный метод. ВЭЖХ, как метод обнаружения данных токсинов является наиболее точным (предел обнаружения ДОН - 0, 05 мг/кг и ЗЛ - 0, 005 мг/кг), но достаточно дорогим из-за высокой стоимости оборудования и реактивов. В обоих случаях требуются сотрудники специальной квалификации.

Альтернативой хроматографическим методам определения микотоксинов стали иммунохимические методы. Концентрация микотоксина определяется с помощью окрашивающего комплекса в микролунках с последующим чтением цвет-

ной реакции на фотометре или визуально относительно показателей стандартов. Метод отличается простотой, дешевизной, экспрессностью, а также возможностью исследовать как единичные пробы, так и десятки (до 90) одновременно.

Целью нашей работы была отработка метода иммуноферментного анализа для количественного определения фузариотоксинов – дезоксиниваленол (ДОН) и зеараленон (ЗЛ) в контаминированном зерне.

В экспериментах использовали конъюгаты микотоксинов ДОН и ЗЛ с бычьим сывороточным альбумином (БСА), специфические сыворотки к микотоксинам, полученные в НИИПББ.

Экстракцию контаминированного зерна проводили смесью растворителей ацетонитрил - вода (6:1) в соотношении 1:5.

Количественное определение микотоксинов проводили с помощью непрямого твердофазного иммуноферментного анализа. В качестве твердофазного антигена использовали конъюгаты БСА-ДОН и БСА-ЗЛ. Для постановки ИФА в сенсibili зированные лунки планшеты вносили по 0,1 мл растворов токсина, испытуемые пробы и специфическую сыворотку к данному токсину. После инкубации при комнатной температуре и отмывки в лунки вносили по 0,2 мл раствора конъюгата антивидовых антител с пероксидазой хрена и выдерживали 1 час в тех же условиях. Ячейки снова отмывали и заливали в них субстратный раствор (2,5 мг 2,2-азинобисэтилбензтиазолин сульфоновой кислоты и 0,1 мл 1% H_2O_2 в 10 мл 0,01 М CH_3COONa). Реакцию останавливали внесением в лунки по 0,05 мл 4М H_2SO_4 . Оптическую плотность в лунках измеряли на анализаторе иммуноферментных реакций «Униплан» АИФР-1 при длине волны 492 нм. На основе известных концентраций стандартного токсина, внесенного в реакцию и полученных данных по оптической плотности, строили калибровочный график. По данному графику определяли концентрацию анализируемых токсинов. В результате исследований установлено, что метод непрямого твердофазного ИФА позволяет выявлять микотоксины ДОН и ЗЛ в контаминированном зерне в концентрациях ниже установленных предельно допустимых.

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОБИОТИКА «ЭНТЕРОСПОРИН» ПРИ Т-2 И АФЛАТОКСИКОЗЕ НОРОК

Самсонов А. И., Семенов Э. И., Тремасов М. Я.

Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных, Казань

Микотоксины являются неизбежными контаминантами кормов, поэтому нельзя исключать возникновение микотоксикозов животных, в том числе у пушных зверей. Согласно данным многих исследователей норки обладают более высокой чувствительностью к микотоксинам по сравнению с сельскохозяйственными и лабораторными животными.

В настоящее время существует множество подходов для профилактики микотоксикозов. Нами испытан в качестве профилактического средства пробиотический препарат «Энтероспорин», созданный в ФГУ «ФЦТРБ» на основе культуры *Bacillus subtilis*. По результатам опытов предыдущих лет «Энтероспорин» показал высокую эффективность при микотоксикозах поросят, птицы и диарее микотоксической и бактериальной этиологии.

Испытание проведено на базе зверосовхоза «Кошачковский» РТ. В опыте использовались самки норок породы «Пастель», массой тела 1,2 – 1,4 кг. Всего сформировано 3 группы животных по 6 норок в каждой. Первая группа с кормом получала в течение 15 суток Т-2 токсин в дозе 200 мкг/кг корма и афлатоксин в дозе 50 мкг/кг корма; вторая - Т-2 токсин и афлатоксин с кормом в тех же дозах и пробиотик «Энтероспорин» 2 мл/гол; третья – биологический контроль, получала обычный рацион. Введение Т-2 токсина и афлатоксина V_1 в рацион норок негативно сказывалось на клинико-гематологических показателях: животные были угнетены, аппетит был снижен, появлялась выраженная диарея, которая протекала на всём протяжении опыта. Применение «Энтероспорина» положительно сказывалось на общем состоянии животных – они были более активны. Аппетит был сохранён у большинства норок, у меньшего количества животных отмечалось незначительное снижение поедаемости корма в начале опыта, однако, в последующем аппетит восстанавливался. Диарея отсутствовала, лишь у 1 норки из 6 отмечалась незначительная и кратковременная (4 суток) диарея - в начале опыта.

Введение Т-2 токсина и афлатоксина V_1 в рацион норок негативно сказывалось на гематологических показателях, так в первой группе к концу опыта по сравнению с группой биологического контроля происходило достоверное уменьшение количества эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина и общего белка на 34, 5; 63, 4; 13, 7 и 12, 3% соответственно. В то же время в группе, получавшей «Энтероспорин», снижение данных параметров по сравнению с группой биологического контроля было ниже на 19, 0; 28, 8; 10, 6 и 5, 6% соответственно.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что применение препарата «Энтероспорин» при Т-2 и афлатоксикозе норок оказывает защитное действие и может использоваться в рекомендуемых дозах в звероводстве для профилактики микотоксикозов норок.

СОРБЕНТЫ - ОСНОВА ПРОФИЛАКТИКИ МИКОТОКСИКОЗОВ

Семёнов Э. И., Тремасов М. Я., Папуниди К. Х.

Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных, Казань

Микотоксины относятся к одной из доминирующих в последние годы групп биогенных ядов, загрязняющих как корма, так и продукты питания. Микроскопические грибы распространены повсеместно и загрязнение ими

кормов, сельскохозяйственной продукции возможно на любом этапе производства, поэтому микотоксины считаются неизбежными контаминантами продуктов питания и кормов и являются общемировой проблемой (Кузнецов А. Ф., 2001, Иванов А. В. соавт., 2008). Микотоксины часто являются причиной низкой продуктивности и повышенной чувствительности животных к инфекционным и другим заболеваниям. А при отсутствии специфических средств профилактики и лечения эти вопросы являются важной проблемой для сельскохозяйственных производителей.

Из множества существующих мер профилактики микотоксикозов: аграрных, правильного хранения кормов, обработке препаратами химического и биологического происхождения и т. д., в последнее время, все большее распространение находят энтеросорбенты из-за совокупности свойств, предъявляемых к профилактическим препаратам: экономичность, физиологичность. Сорбенты удобны в транспортировке и применении в условиях активного животноводства (Рабинович М. И. и др., 2002).

В настоящее время сельскохозяйственным предприятиям предлагается широкий спектр разнообразных энтеросорбентов: минеральных, органических, смешанных и комплексных, содержащих дополнительные ингредиенты (кислоты, ферменты и др.). Специалисты хозяйств иногда затрудняются в выборе того или иного вида сорбента.

Во ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных» проводятся многолетние исследования по воздействию микотоксинов на организм и изысканию средств лечения и профилактики микотоксикозов, в том числе изучаются эфферентные способы профилактики. Исследования показали, что отечественные сорбенты и сырьё для сорбентов не уступают в профилактической активности зарубежным аналогам, и переплачивать за импортную марку нет необходимости.

Изучение эффективности бентонитов и цеолитов (основных компонентов зарубежных сорбентов) месторождений располагающихся в России показало, что их применение оказало достоверно положительный защитный эффект на основные показатели организма животных, не уступают дрожжевым сорбентам и по ряду показателей значительно их превосходят. К тому же их профилактическое действие заключается не только в сорбции ядов поступающих с кормами, но и в сорбции веществ, участвующих в гепато- и гемоэнтеральной циркуляции, веществ, образующихся в кишечнике при гидролизе корма, сорбции микроорганизмов и их токсинов, связывании газов, изменении консистенции химуса, стимуляции функциональной активности органов пищеварения. Кроме того, имеется опосредованный эффект заключающийся в предотвращении и ослаблении аллергических реакций, функциональной разгрузке органов детоксикации, коррекции обменных процессов.

Ветеринарная практика и наука подтвердила, что без применения энтеросорбентов сложно добиться оптимальных производственных результатов, особенно при наших климатических и экономических условиях, часто приходится кормить животных «с колёс», без предварительной проверки качества кормов и поэтому залогом высокой продуктивности и предотвращения огромного ущерба причиняемого микотоксинами является обязательное применение энтеросорбентов.

ТОКСИНООБРАЗУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЯ ФУЗАРИОЗА ТОМАТА

Сидорова С. Г., Спасская А. М.

Белорусский государственный университет, Минск

Томат занимает одно из лидирующих мест в мировом производстве овощей, преобладая в структуре посевных площадей всех экономически развитых стран. Эта культура имеет большое значение для обеспечения полноценного рациона людей, поскольку томаты содержат в легкоусвояемой форме все основные энергосодержащие вещества: углеводы, белки, жиры. Однако эффективному возделыванию томатов препятствует подверженность различным заболеваниям, в частности, фузариозам, существенно снижающим урожай и качество плодов. С 1984 г. фузариоз томатов зарегистрирован в защищенном грунте Беларуси и стал фактором, регулярно вызывающим массовое поражение растений (Поликсенова В. Д., 1987). Мониторинг фитопатологической ситуации в XXI веке показал, что из грибных болезней в закрытом грунте на томате доминирует фузариозное увядание (возбудитель – *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* (Sacc) Snyder and Hansen) (Жердецкая Т. Н., 2006).

Грибы рода *Fusarium* относятся к некротрофам, которые прежде чем оккупировать какой-либо участок растительной ткани, убивают его своими токсичными выделениями. Различные штаммы *F. oxysporum* синтезируют целый комплекс токсинов: фузариевая кислота ($C_{10}H_{13}O_2N$), аспергилломаразмин А ($C_{10}H_{17}O_8N_3$), аспергилломаразмин В ($C_9H_{14}O_8N_2$), ликомаразмин ($C_9H_{15}O_7N_3$), дегидрофузариевая кислота ($C_{10}H_{21}O_2$). Высокая биохимическая активность *F. oxysporum* (токсино- и ферментообразование) определяет, в том числе, и высокую пластичность вида. Известно, что одним из наиболее распространенных факторов токсичности грибов рода *Fusarium* является фузариевая кислота.

В ходе экспериментальных исследований нами проведен скрининг 30 изолятов *F. oxysporum* f. *lycopersici* по способности синтезировать фузариевую кислоту в условиях чистой культуры. Содержание фузариевой кислоты в культуральной жидкости изолятов фузариума определяли спектрофотометрически по методике Я. Г. Оголовец и В. С. Пономаревой (1966) цит. по (Половинко Г. П., 1979). Установлено, что у 20 % изученных изолятов *F. oxysporum* f. *lycopersici* содержание фузариевой кислоты в культуральной жидкости колебалось от 410, 69 до 750, 12 мкг/мл. Вместе с тем, у 17 % изолятов фузариума наблюдалось отсутствие в культуральной жидкости изучаемого неспецифического ток-

сина. Остальные изоляты *F. oxysporum f. lycopersici* характеризовались токсинообразующей способностью, уровень которой колебался от 7, 98 до 367, 5 мкг/мл. Вместе с тем, нами установлено, что, в целом, агрессивность изученных изолятов фузариума слабо коррелирует ($r=0,14$) со способностью продуцирования только фузариевой кислоты.

В настоящее время на различных сельскохозяйственных культурах показана эффективность применения продуктов метаболизма патогенов при разработке экспресс-методов оценки болезнеустойчивости как по гаметофиту, так и по спорофиту.

Нами изучена отзывчивость различных по фузариозоустойчивости сортов томата на содержание фузариевой кислоты в среде при проращивании семян. Влияние фузариевой кислоты на прорастание семян томата определяли методом биопроб (Берестецкий О. А., 1982). Семена опытных вариантов, предварительно замоченные в растворах фузариевой кислоты в концентрациях 0, 1; 0, 3 и 0, 5 г/л в течение 24 ч, помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную водой. Контролем служили семена, замоченные в дистиллированной воде. В ходе исследований установлено ингибирующее воздействие (в пределах 14 - 20 %) фузариевой кислоты на прорастание семян восприимчивого сорта Перемога 165 при всех изученных концентрациях, а угнетение развития корней 5-ти суточных проростков – при концентрациях 0, 3 и 0, 5 г/л ($t_{\phi}=2, 47$ и $5, 42$ соответственно; $t_{st} = 1, 96$ при $P < 0, 05$). Для фузариозоустойчивых сортов Walter и Heinz 1370 выявлена более слабая реакция ингибирования прорастания семян и развития проростков, которая проявилась только при максимальном (0, 5 г/л) содержании фузариевой кислоты.

ГЕНЕТИКА БИОСИНТЕЗА ФУЗАРИЕВЫХ ТРИХОТЕЦЕНОВ

Соколова Г. Д.

ВНИИ фитопатологии, Большие Вяземы, Московская обл.

Образование трихотеценовых микотоксинов является многоступенчатым процессом и начинается с изопреноидного предшественника фарнезилпирофосфата. Ключевой реакцией перехода к биосинтезу трихотеценов служит реакция изомеризации-циклизации фарнезилпирофосфата в триходиен, которая катализируется триходиен-синтазой. Этот фермент был выделен и очищен до гомогенности хроматографическими методами из мицелиального гомогената *F. sporotrichioides* в 1986 г. (Hohn, VanMiddlesworth 1986), а в 1989 г. из того же гриба был клонирован ген, обозначаемый теперь как *Tri5*, кодирующий триходиен-синтазу (Hohn, Veremand, 1989). Это был первый клонированный ген трихотеценового биосинтеза. Впоследствии были идентифицированы почти все гены, вовлеченные в 15-стадийный биосинтез Т-2 токсина изолятом *F. sporotrichioides*.

Большинство генов оказалось сгруппированным в 26-kb кластер с *Tri5* геном в центре, поэтому этот кластер обозначают как *Tri5*-кластер. Помимо 7 генов, непосредственно задействованных в биосинтезе трихотеценов, *TRI5*-кластер содержит еще несколько генов, кодирующих белки с функцией регуляторов транскрипции и переносчиков трихотеценов. Кроме *TRI5*- кластера имеются еще три небольших сайта, где расположены трихотеценовые биосинтетические и регуляторные гены (Desjardins, Proctor, 2007).

Поскольку каждая из стадий биосинтеза трихотеценов катализируется специфическим ферментным белком, кодируемым соответствующим геном, изменения в нуклеотидных последовательностях отдельных генов приводят к изменению функций кодируемых ферментов, либо к превращению генов в нефункционирующие псевдогены, что сопровождается изменением спектра продуцируемых трихотеценов.

Каждый из примерно полутора десятков трихотеценов-продуцирующих видов *Fusarium* характеризуется определенными изменениями в нуклеотидных последовательностях тех генов, которые обеспечивают образование характерных для данного вида трихотеценовых микотоксинов.

Так, изоляты *F. sambucinum*, не имеющие функциональных *Tri1* и *Tri16* генов, которые в *F. sporotrichioides* кодируют С-8 гидроксиллазу и С-8 ацилтрансферазу, продуцируют 4, 15-диацетоксисцирпенол (ДАС) – трихотецен, не имеющий заместителей в положении С-8.

Значительные изменения в нуклеотидной последовательности гена *Tri1* в *F. graminearum* и *F. culmorum* обеспечивают мультифункциональность кодируемого этим геном фермента, катализирующего оксигенирование двух положений – С-8 и С-7. В результате эти виды продуцируют трихотецены типа В – ниваленол (НИВ) и дезоксиниваленол (ДОН). При этом продуценты ДОН, не имеющие заместителей в С-4 положении, содержат соответствующие нефункциональные псевдогены (*Tri13* и *Tri7*). Кроме того, различия в нуклеотидных последовательностях *Tri3* гена, кодирующего С-15-ацетилтрансферазу, приводят к тому, что среди ДОН-продуцентов встречаются изоляты, не образующие в ходе биосинтеза ацетилированных в положении С-15 полупродуктов (содержат псевдоген *Tri3*). Такие изоляты принято относить к Ia (ДОН +3-АсДОН) хемотипу в отличие от Ib (ДОН +15-АсДОН) хемотипа с функциональным *Tri3* геном.

Знание генетики биосинтеза трихотеценов открывает широкие возможности использования методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) для изучения разных вопросов, связанных с трихотеценов-продуцирующими грибами: их обнаружением, хемотипированием, ареалом распространения, эволюцией, влиянием факторов окружающей среды на токсиногенез и изучением роли микотоксинов в экологии грибов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МИКОТОКСИКОЗЫ У ПОРОСЯТ

Солдатенко Н. А., Фетисов Л. Н., Стрельцов Н. В., Русанов В. А.
Северо-Кавказский зональный НИВИ, Новочеркасск
Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону

В санитарно-гигиенических нормах для кормов по некоторым микотоксинам указанные минимально допустимые уровни (МДУ) не дифференцированы для разных возрастных групп. Однако практика показывает, что молодые животные гораздо чувствительнее к микотоксинам, чем взрослые. Целью наших исследований было определение минимально опасного уровня микотоксинов для поросят отъемного возраста (2мес.). В опыте были сформированы 4 группы животных по принципу аналогов. Помимо основного рациона животные опытных групп получали с кормом микотоксины в течение 10 дней. Первая группа получала корм, содержащий стеригматоцистин в количестве 20 мкг/кг корма. Вторая группа – Т-2 токсин, 30мкг/кг корма. Третья группа – охратоксин А1, 30 мкг/кг корма. Четвертая контрольная группа получала основной рацион без микотоксинов. По окончании скармливания у животных взяли пробы крови, пробы образцов внутренних органов и мышечной ткани. Биохимические и гематологические исследования произвели на автоматических анализаторах Eos Bravo Forte и NemaScreen 18 (Hospitex Diagnostics®, Italia) по общепринятым методикам. Содержание микотоксинов в органах и тканях определяли методом иммуноферментного анализа по ГОСТ Р52471 с использованием диагностических наборов, изготовленных ООО «Фарматек».

Результаты. Стеригматоцистин в количестве в 4 раза меньшем МДУ при длительном (10 дней) поступлении с кормом вызывает у поросят отъемного возраста тяжелые поражения печени, сопровождающиеся дегенеративно-дистрофическими изменениями с образованием в паренхиме множественных участков некроза (до 10 на 1дм²).

Охратоксин А1 помимо известного нефротоксического действия в данном опыте обнаружил гепатотоксический эффект почти такой же интенсивности, что и стеригматоцистин. У всех животных в паренхиме печени отметили такие же очажки некроза, но в меньшем количестве (2-3 на 1дм²).

Биохимические исследования показали значительное увеличение активности аланинаминотрансферазы (АлАТ): у животных опытных групп она была более чем в 2 раза выше, чем у контрольных. В то же время активность аспартатаминотрансферазы (АСаТ) была несколько снижена. Коэффициент Ритиса (АСаТ/АлАТ) составил меньше 0,5, что указывало на поражение паренхимы печени у животных всех опытных групп. У поросят опытных групп также установили повышение уровня щелочной фосфатазы (ЩФ), что можно расценивать как признак токсической желтухи. О тяжелом поражении печени у поросят всех опытных групп свидетельствовало нарастание в 3-4 раза количества билирубина в сыворотке крови.

В опытной группе, где животные получали с кормом охратоксин А1, уровень мочевины в сыворотке крови был выше, чем у поросят контрольной группы и других опытных групп. Это указывает на то, что у животных под действием охратоксина развивается почечная недостаточность, сопровождающаяся усиленным распадом белка.

С помощью метода конкурентного твердофазного ИФА удалось обнаружить охратоксин А1 в крови и тканях органов (печень, почки). Наблюдается не просто попадание этого токсина в кровь, но и его кумуляция в печени: в образцах печени концентрация токсина была в 20 раз (!) выше, чем в крови.

СОЧЕТАННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ Т-2 ТОКСИНА И КАДМИЯ НА ОРГАНИЗМ ОВЕЦ

Софронов П. В., Шарафутдинова Д. Р., Конюхова В. А.
Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных, Казань

Антропогенное воздействие на окружающую среду в настоящее время достигло громадных размеров. В этой связи все чаще в кормах обнаруживаются токсиканты как природного, так и техногенного происхождения. Однако суммарный токсический эффект этих токсикантов на живые организмы при совместном поступлении недостаточно изучен.

Целью настоящего исследования явилось изучение токсического действия Т-2 токсина и кадмия при совместном поступлении.

Опыты проведены на 9 животных и были разделены на 3 группы по 3 головы в каждой. В течение всего эксперимента (30 суток) овцы перорально, в виде болусов получали Т-2 токсин в дозе 0,1 мг/кг (первая группа), кадмий в дозе 0,3 мг/кг (вторая группа) и вместе Т-2 токсин и кадмий в аналогичных дозах (третья группа).

Раньше всех клинические признаки отравления начали проявляться у овец, получавших сочетание Т-2 токсин и кадмий. Через 16 суток с начала опыта, у этих овец отмечалось угнетение, снижение аппетита; спустя еще четверо суток (20-22-й день эксперимента) появилась диарея, эрозии кожи губ и слизистой оболочки ротовой полости. У животных первой и второй групп угнетение, снижение аппетита и диарея проявились на 21-й и 24-й день.

У животных, получавших кадмий, количество эритроцитов на 30-е сутки эксперимента снизилось на 10,2%. У овец, получавших Т-2 токсин этот показатель снижался незначительно в течение 30 суток наблюдений. При сочетанном воздействии Т-2 токсина и кадмия спустя 30 суток этот показатель снизился на 18% в сравнении с фоном.

Количество лейкоцитов снижалось в течение всего времени эксперимента и к 30 суткам было ниже исходных данных на 10, 4% у овец первой группы, на 5% - во второй группе и на 23, 8% - в третьей. Незначительное снижение количества гемоглобина отмечалось во все сроки исследования.

Содержание общего белка в сыворотке крови всех подопытных овец, в течение всего эксперимента постоянно снижалось. Наиболее значительное снижение отмечалось к концу эксперимента, в группе овец, получавших совместно Т-2 токсин и кадмий – 23%, при поступлении только Т-2 токсина – на 12%, кадмия – на 10%.

Уровень альбуминов, α - и γ -глобулинов в течение всего эксперимента снижался незначительно, тогда как количество β -глобулинов в первой, второй и третьей группах увеличивалось на 30 сутки на 15, 37 и 100% соответственно.

У овец получавших кадмий, происходило угнетение активности холинэстеразы, и к 30 суткам активность фермента была ниже первоначальных показателей на 19%, у овец, получавших Т-2 токсин. Снижение активности в этот срок составило 23, 7%; в группе овец, при сочетанном воздействии токсикантов – 26%. Активность щелочной фосфатазы в крови овец первой группы к 30 суткам увеличилась на 92, 3%; во второй группе – на 92, 9; в третьей – на 106, 9%.

Содержание АЛТ в крови овец первой группы к 30 суткам увеличилось на 27%, во второй группе на 28, в третьей на 35%; а активность АСТ на 32, 29 и 42% соответственно.

Наблюдалось снижение количества SH-групп в первой группе на 11%, во второй – на 37, в третьей – на 43%.

Сочетанное действие Т-2 токсина и кадмия характеризуется более выраженными гематологическими и биохимическими изменениями, чем при раздельном введении токсикантов, и сопровождается снижением количества эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов, уменьшение общего белка и изменением соотношения его фракций.

ДИАГНОСТИКА ТОКСИГЕННЫХ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM* МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР

Стахеев А. А.¹, Рязанцев Д. Ю.¹, Гаврилова О. П.², Гагкаева Т. Ю.², Завриев С. К.¹

¹Институт Биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва

²Всероссийский НИИ защиты растений РАСХН, Санкт-Петербург-Пушкин

Фузариоз колоса распространен по всему миру и является одним из самых опасных заболеваний злаковых. Следствием заражения являются существенные потери урожая, ухудшение качества зерна, а также накопление микотоксинов – вторичных метаболитов грибов, представляющих угрозу для здоровья человека и животных. Для грибов рода *Fusarium* характерно продуцирование таких микотоксинов, как трихотецены, монилиформин, зеараленон, энниатины. Важно отметить, что образование токсинов носит ярко выраженный видоспецифичный характер.

Учитывая широкое распространение возбудителей фузариозов и представляемую ими опасность, необходим постоянный мониторинг зерна и продуктов его переработки на заражённость этими патогенами. Важно отметить, что при закладке на хранение зерна микотоксины могут не выявляться, однако их продуцирование может начаться под воздействием биотических и абиотических стрессов. В связи с этим необходима точная идентификация патогена, позволяющая предсказать, накопление каких токсинов возможно в конкретной партии зерна. Микробиологические методы анализа весьма трудоёмки и не позволяют диагностировать заболевание, протекающее в латентной форме. Сегодня для диагностики патогенов широко используемым методом количественной ПЦР-РВ «ПЦР в реальном времени», преимуществом которого являются высокая чувствительность и специфичность анализа, и скорость получения результатов.

В настоящей работе на основе ПЦР-РВ разработаны тест-системы, позволяющие детектировать токсигенные грибы рода *Fusarium* в соответствии со спектром продуцируемых ими микотоксинов. На основании известных данных по этому признаку было выделено 4 группы видов: продуценты трихотеценов типа А (*F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*); продуценты трихотеценов типа В (*F. graminearum*, *F. culmorum*); смешанный хемотип А-В (*F. poae*); трихотецен-непродуцирующие виды (*F. avenaceum*, *F. tricinctum*). К каждой из групп подобрана пара праймеров, и зонд типа TaqMan, специфичность которых протестирована на 26 моноспоровых изолятах грибов рода *Fusarium*. Кроме того, проведён ряд тестов на большом количестве полевых образцах зараженного зерна. Совокупность полученных результатов позволяет считать, что разработанные системы могут стать основой для создания стандартных ПЦР-наборов для рутинной диагностики потенциальных продуцентов опасных токсинов в закладываемом на хранение зерне и продуктах его переработки.

ПРОБЛЕМЫ АФЛАТОКСИКОЗОВ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

Танасева С. А., Садыкова В. Н., Степанов В. И.

Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных, Казань

Корма загрязненные вторичными продуктами жизнедеятельности микроскопических грибов - микотоксинами, представляют большую опасность для животных и человека. Микотоксины могут загрязнять практически все виды кормов. Они воздействуют почти на все органы и системы организма, обладают канцерогенными, мутагенными, тератогенными, эм-

бриотоксическими свойствами, способны ослаблять резистентность организма к инфекционным и незаразным болезням. Чрезвычайно высокой токсичностью среди микотоксинов отличаются афлатоксины.

К афлатоксинам восприимчивы все виды сельскохозяйственных и домашних животных, пушные звери и птицы. Болезнь проявляется перерождением и некрозом печени, нефритом, гастритом, кровоизлияниями во внутренних органах, снижением прироста массы тела вследствие подавления синтеза белка и нуклеиновых кислот. Афлатоксины являются мощным канцерогеном для человека и животных. Загрязнение зерна и другой сельскохозяйственной продукции возможно на всех этапах их производства, хранения, переработки и транспортировки.

Нами проведен анализ кормов, продовольственного сырья и продуктов питания, поступающих из различных регионов РФ и из-за рубежа на содержание афлатоксинов. В ходе проведенных исследований, афлатоксины обнаружены в кормах, поступивших из Ростовской, Самарской, Саратовской, Нижегородской, Калужской, Магаданской и Белгородской областей, Краснодарского и Приморского краев, республик Марий Эл, Татарстан, Башкортостан, Мордовия, Чувашия, Удмуртия и др. . Наиболее зараженными афлатоксинами оказались соя, кукуруза, пшеница, комбикорма и силос. В комбикормах из этих регионов афлатоксин В₁ присутствовал в основном за счет включения в рацион привозных добавок шрота соевого и жмыха подсолнечного, так большинство проб соевого шрота (84%) содержали афлатоксин В₁ в концентрациях от 10 до 240 мкг/кг, в 42, 7% образцов жмыха подсолнечного микотоксин был обнаружен в концентрациях от 20 до 180 мкг/кг.

В результате нарушения правил агротехники, хранения и заготовки кормов происходит контаминация микотоксинов и ветеринарным специалистам очень сложно предотвратить отравление животных. Все это указывает на актуальность проблемы афлатоксинов, а также необходимость контроля качества кормов и совершенствование мер профилактики и лечения.

Одним из современных подходов к проблеме снижения вреда от негативного воздействия микотоксинов у животных является применение различных энтеросорбентов. Нами проведено определение эффективности адсорбции афлатоксина В₁ (in vitro) коммерческим сорбентом «Полисорб ВП» и новым сорбентом - фитоуголь. Фитоуголь - новый адсорбент, разработанный ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» совместно с КГТУ полученный путем карбонизации поверхности органического полисахарида, что позволило в фитоугле сочетать свойства органического и неорганического сорбента. Адсорбционная способность в отношении афлатоксина В₁ у энтеросорбента «Полисорб ВП» составила 76, 9%, у фитоугля - 61, 6%, что свидетельствует о перспективности использования нового сорбента для сорбции афлатоксина В₁.

Учитывая механизм действия афлатоксинов при выборе лечебных средств очевидна необходимость применения веществ с гепатозащитными свойствами. В соответствии с современной классификацией лекарственных средств из их числа выделяют сравнительно небольшую группу гепатопротекторов, обладающих избирательным терапевтическим влиянием на печень. На сегодняшний день применение гепатопротекторов при отравлениях ксенобиотиками имеет преимущественно познавательно-информативный характер, поэтому в дальнейшем актуально применение веществ с гепатозащитными свойствами при афлатоксикозе.

АЛИМЕНТАРНЫЕ ЭНДОМЕТРИТЫ ПРИ ПАТУЛИНОТОКСИКОЗЕ

Тремасова А. М.¹, Ахметов Ф. Г.², Сагдеева З. Х.¹

¹ Федеральное учреждение «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных»

² Республиканская ветеринарная лаборатория, Казань

Из-за нарушения технологии производства кормов происходит снижение их питательности и санитарного качества. В первую очередь это обусловлено загрязнением кормов микроскопическими грибами и вырабатываемыми ими микотоксинами. Почти все микотоксины, в частности патулин, вызывают аборт сельскохозяйственных животных, которые часто сопровождаются развитием эндометритов, вследствие нарушения микробиоты в организме коров, что способствует росту и развитию патогенных микроорганизмов, например *C. albicans*, которые преимущественно поражают органы воспроизводства, на этом фоне активизируется условно-патогенная микрофлора, развиваются эндометриты.

Имеющийся спектр противогрибковых химических соединений не всегда отвечает современным требованиям из-за высокой токсичности, длительного курса применения и дороговизны.

В ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» создан серосодержащий препарат ДС -2, обладающий высокой противогрибковой активностью.

Опыты проведены на коровах голштинской породы, разделенных по принципу аналогов на три группы (n=10). Установлено, что возникновение эндометритов у коров напрямую связано с поеданием ими кормов, загрязненных микотоксином патулином в количестве 10±0, 2 мг/кг.

Коровам первой группы в качестве средства лечения эндометрита применяли ДС-2, 2-4-хкратно, внутриматочно в дозе 100 мл с интервалом введения 24 часа. Коров второй группы лечили с использованием суппозиторий, содержащих 5% эфорана (3-5-кратно). Коров третьей группы лечили инъекциями окситетрациклина гидрохлорида (5 мг/кг) и окситоцина (подкожно 30 ЕД)- принятый в хозяйстве метод.

Контроль за эффективностью терапии вели путем изучения клинических, гематологических, биохимических показателей, по срокам выздоровления, процента оплодотворения животных, получения приплода и его жизнеспособности.

У коров первой группы был получен наиболее выраженный лечебный эффект. Истечения из половых путей спустя 5-6 сут становились прозрачными, слизистыми, незначительными и непостоянными. Сократительная способность матки восстанавливалась на 14-16 сут у 60% животных. Во второй группе улучшение общего состояния животных отмечали на 5-6 сут позднее, чем у коров первой группы.

В процессе лечения у коров первой и второй группы отмечалась тенденция к увеличению количества эритроцитов и гемоглобина в крови, а количество лейкоцитов, первоначально превышающих норму, снижалось. Достоверных изменений в гематологических и биохимических показателях у животных третьей группы не отмечалось. При микробиологическом исследовании влагалищной слизи у коров первой группы гриба рода *Candida*, кишечная палочка, стрепто-, дипло-, стафилококки не выделялись.

Из полученных данных следует, что лечение больных эндометритом коров препаратом ДС-2 в большинстве своем сопровождается восстановлением клинических, морфологических и биохимических показателей крови, репродуктивной способности у 80-95% животных. Исключение из рациона кормов, содержащих патулин, ускоряет процесс выздоровления большинства животных. Использование для лечения эндометритов эфорана способствует кратковременному улучшению состояния коров и выздоровлению не более 40% больных животных. Метод лечения, применяемый в хозяйстве с использованием окситетрациклина гидрохлорида, не эффективен при эндометритах, вызванных патулином.

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОХРАТОКСИНА А

Урусов А. Е., Костенко С. Н., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б.

Институт биохимии имени А. Н. Баха РАН, Москва

Киевский национальный университет имени Т. Г. Шевченко, Киев

Охратоксин А является повсеместно распространенным микотоксином, обнаруживается во многих видах сельскохозяйственной продукции. Данному соединению уделяется значительное внимание в силу серьезного экономического ущерба и большой опасности для здоровья. Как правило, для определения охратоксина А используются физико-химические и иммуноаналитические методы.

Наиболее перспективным направлением в иммуноанализе является иммунохроматография. Иммунохроматографический анализ основан на проведении специфического взаимодействия на тест-полоске в формате «сухой химии», когда контакт тест-полоски с пробой непосредственно инициирует все последующие процессы, обеспечивающие развитие аналитического сигнала. Такие системы обладают рядом преимуществ – быстрота получения результатов, низкая трудоемкость, стабильность при хранении, низкая стоимость.

Нами разработана иммунохроматографическая тест-система для определения охратоксина А в сельскохозяйственной продукции. В качестве маркера в тест-системе было использовано коллоидное золото. Получены наночастицы золота, средний диаметр которых по данным электронной микроскопии составил 27 нм, а эллиптичность 1, 22. Синтезирована серия конъюгатов коллоидного золота и моноклональных антител к охратоксину А с разным количеством антител, иммобилизованных на одной частице. Реализована схема иммунохроматографического анализа, основанная на конкуренции охратоксина в пробе и иммобилизованного конъюгата охратоксин А – белок за связывание с антителами на частицах коллоидного золота. Система оптимизирована для работы с растительными экстрактами; при этом возможно проведение анализа в среде с высоким содержанием органического растворителя (до 35% метанола). При визуальной детекции результатов полное исчезновение полосы в аналитической зоне наблюдается при концентрации охратоксина А 60 нг/мл. При видеорегистрации изменений интенсивности окрашивания предел обнаружения охратоксина А составляет менее 0, 3 нг/мл. Продолжительность анализа – 15 минут. Показана пригодность разработанного метода для тестирования экстрактов кукурузы и ячменя.

Работа выполнена при поддержке проекта ЕС MucRed и гранта РФФИ 09-03-90412-Укр_ф_а.

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОХРАТОКСИНА А С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОПТИЧЕСКОГО СЕНСОРА VIACORE

Урусов А. Е., Костенко С. Н., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б.

Институт биохимии имени А. Н. Баха РАН, Москва

Киевский национальный университет имени Т. Г. Шевченко, Киев

В связи с большим распространением микотоксинов в сельскохозяйственной продукции, активно ведутся разработки быстрых и точных методов их обнаружения. Для решения этих задач весьма перспективны иммуноаналитические методы. Хотя иммуноферментный анализ широко используется при мониторинге микотоксинов, разработка биосенсорных системы может существенно расширить области применения иммунодетекции, позволяя проводить анализ быстро, просто и автоматизированно.

Целью нашей работы было создание метода определения охратоксина А с использованием коммерческого безмаркерного оптического сенсора Biosoge. Данный инструмент основан на явлении поверхностного плазмонного резонанса (ППР), наблюдаемом для тонких электропроводящих пленок на поверхности сред с разными показателями преломления. В приборах Biosoge, доминирующих на сегодняшний день средствах регистрации ППР, этими средами являются стеклянная поверхность сенсорного чипа и раствор анализируемого образца, а проводящей пленкой – тонкий слой золота между ними. При определенных комбинациях угла падения и длины волны падающий свет возбуждает в золотой пленке плазмоны – волны колебаний электронной плотности. Это приводит к поглощению энергии (затуханию волны), регистрируемому как падение интенсивности отраженного света. Условия генерации плазмонов очень чувствительны к свойствам раствора на поверхности сенсорного чипа. Благодаря этому, пропуская образец, содержащий лиганд, вдоль поверхности сенсорного чипа с иммобилизованными рецепторными молекулами, можно непосредственно регистрировать взаимодействие лиганд–рецептор. Данный подход позволяет проводить измерения в реальном времени, а на основе полученных сенсограмм рассчитывать содержание определяемого соединения

В предложенной нами системе на поверхности декстранового чипа CM5 был иммобилизован конъюгат охратоксин А – белок, а через ячейку пропускалась смесь пробы, содержащей охратоксин А, и специфических антител. Регистрировался уровень специфического взаимодействия через 700 сек. после внесения антител и охратоксина А. Была проведена оптимизация условий анализа как по количеству иммобилизованного на сенсорном чипе конъюгата охратоксин-белок, так и по количеству используемых в анализе антител. Достигнут предел обнаружения охратоксина А, равный 0,4 нг/мл при продолжительности анализа 15 мин.

Работа выполнена при поддержке государственного контракта № П975 от 20 августа 2009 г. в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

ТОКСИГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ГРИБОВ – ПРОДУЦЕНТОВ СТЕРИГМАТОЦИСТИНА

Харченко С. М., Башта О. В.

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев

Стеригматоцистин – вторичный метаболит грибов *Aspergillus versicolor*, *A. nidulans*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *Penicillium luteum*, *Chaetomium trielavioideum*. Острая токсичность микотоксина проявляется главным образом некрозом печени и почечных протоков. По токсичности стеригматоцистин значительно уступает афлатоксину В₁, однако, канцерогенное действие его сильнее.

Стеригматоцистин и его производные обнаружены в кормах и некоторых сельскохозяйственных продуктах.

Цель наших исследований – определить продуцентов стеригматоцистина на зерне пшеницы, кукурузы из различных регионов Украины и изучить зависимость процесса биосинтеза микотоксина от используемого субстрата.

Стеригматоцистин из подопытных образцов зерна извлекали смесью ацетонитрила и 4%-ного раствора калия хлористого в соотношении 9:1 при встряхивании на шуттель – аппарате в течение часа. Соотношение субстрат – экстрагент было 1:4. Для очистки исходного экстракта от сопутствующих примесей применяли хроматографию в системе гексан – ацетон (1:1) с последующей переэкстракцией токсина в хлороформе.

Стеригматоцистин в образцах идентифицировали путем хроматографии исследуемой пробы зерна и стандарта токсина на пластинах «Силуфол» в системе растворителей толуол – этилацетат – 85%-ная муравьиная кислота (5:4:1). Наличие стеригматоцистина в вариантах подтверждалось положительной реакцией с алюминием хлористым. Нами было проведено исследование 157 культур грибов рода *Aspergillus* и 85 видов из рода *Penicillium*.

По нашим данным продуценты стеригматоцистина составили 18,4% от общего числа исследованных потенциальных продуцентов этого микотоксина.

Количество стеригматоцистина в образцах определяли методом тонкослойной хроматографии, сравнивая интенсивность флуоресценции микотоксина в опыте с серией проб стандартного его раствора. Содержание стеригматоцистина в исследуемых образцах просчитывали по формуле.

Установили, что количество образующегося стеригматоцистина находится в зависимости от природы субстрата на котором культивировали продуцент. Наиболее интенсивно микотоксин накапливался на зерне пшеницы (97,3 мг/кг), меньше – на зерне кукурузы (80,5 мг/кг).

К ВОПРОСУ О ДЕТОКСИКАЦИЯ ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ГРИБАМИ КСИЛОТРОФАМИ

Чхенкели В. А., Николаева Л. А.

Иркутский филиал Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН, Иркутский государственный медицинский университет

На предприятиях целлюлозно-бумажной промышленности, использующих для отбеливания целлюлозы молекулярный хлор, образуются полихлорированные дибензо – п-диоксины (ПХДД) и дибензофураны (ПХДФ) – высоко-

котоксиные, канцерогенные соединения. При изучении химического состава шлам – лигнина ОАО «Байкальский ЦБК» (БЦБК) методом хромато-масс – спектрометрии было идентифицировано более 60 соединений, среди которых хлорированные углеводороды составили 17, 2 %, производные фенолов – 5-15 %, фуранов – 9, 3 %, бензолов – 2, 5 %.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении изменения химического состава шлам – лигнина – отхода производства ОАО «Байкальский ЦБК» (БЦБК) – под воздействием грибов – ксилотрофов при культивировании их методом твердофазной ферментации (ТФФ). С целью изучения возможности использования методов биотехнологии для утилизации отходов целлюлозно – бумажной промышленности (ЦБП) шлам – лигнин БЦБК засеивали суспензией продуцентов *Trametes pubescens* (Shum. :Fr.) Pilat. штамм 0663 и *Schizophyllum commune* Fr. штамм 0459 из коллекции Ботанического института имени В. Л. Комарова РАН (г. С. –Петербург) и проводили ТФФ в течение 1, 5 – 2 месяцев при 37 °С. Подготовку проб твёрдых отходов и проб отходов, подвергнутых твердофазной ферментации с использованием грибов – продуцентов, для определения общего состава углеводов проводили в соответствии с методикой Агентства по окружающей среде США (EPA) № 1613 с предварительной экстракцией хлористым метилом – гексаном (1:1), очисткой экстрактов посредством препаративной колоночной хроматографии. Изомерспецифический анализ выполняли с использованием хромато – масс – спектрометра Hewlett Packard модели Hp 5972A и масс – селективного детектора HP MSD 5972 в режиме селективного детектирования молекулярных ионов. Разделение проводили на кварцевой капиллярной колонке HP – 5 с параметрами 25 м x 0, 25 мм в температурном режиме программирования от 40 до 310 °С со скоростью 10 °С в мин. Идентификацию органических веществ осуществляли с помощью библиотечного поиска в библиотеке HP – Pest, Wiley – 138 – компьютера и по времени удерживания. Интегрировали площади пиков, полученных по извлечённым молекулярным или характеристическим ионам соответствующих органических веществ.

При ТФФ шлам – лигнина хлорорганические компоненты, фенолы, фураны, бензолы не были обнаружены. Кроме того, в результате деструкции лигнина увеличилось количество нециклических соединений, что является подтверждением высокой активности продуцента *T. pubescens* разрушать ароматические кольца. После обработки шлама продуцентом *Sch. commune* в его составе произошло увеличение доли ароматических соединений за счёт циклизации непредельных углеводов, что можно объяснить особенностями метаболизма продуцентов. Расчёты показали, что эффективность разрушения суммы циклических соединений штаммом *T. pubescens* для отходов БЦБК составила 21, 37 %, а для отходов ОАО «Братсккомплекс – холдинг» – только 0, 46%, эффективность разрушения соединений, способных к образованию диоксинов – 100 % (фенолов, хлорсодержащих соединений). Таким образом, установлено, что в качестве биологического метода обезвреживания твёрдых отходов ЦБП, содержащих хлорорганические ароматические соединения, можно рекомендовать метод утилизации шлам – лигнина с использованием штамма дереворазрушающего базидиомицета *T. pubescens* 0663. Такой метод является экологически безопасным и одним из многообещающих методов обезвреживания хлорорганических соединений в природных объектах.

ОЦЕНКА ЗАГРЯЗНЕНИЯ МИКОТОКСИНАМИ ЗЕРНА УРОЖАЕВ 2006-2008 ГОДОВ

Эллер К. И., Седова И. Б., Захарова Л. П., Аксёнов И. В., Аристархова Т. В.,
Пименова В. В., Передеряев О. И., Селифанов А. В., Тутельян В. А.
НИИ питания РАМН, Москва

В последнее время внедрение современных высокочувствительных методов анализа микотоксинов (МТ) позволило расширить возможности мониторинга загрязнения продовольственного сырья МТ, повысить информативность и надёжность результатов.

Для исследования МТ дезоксиниваленола (ДОН), зеараленона (ЗЛ), охратоксина А (ОТА), фумонизинов В₁ (ФВ₁) и В₂ (ФВ₂) в продовольственном зерне пшеницы, ячменя, ржи, овса и кукурузы урожаев 2006-2008 гг. из Южного, Дальневосточного, Центрального, Приволжского, Сибирского Федеральных округов России использовали методы ВЭЖХ с высокоселективной иммуноаффинной очисткой и для анализов токсинов Т-2 и НТ-2 – комбинацию ИФА с ВЭЖХ-МС. Пределы обнаружения ОТА, ЗЛ, ДОН, ФВ₁ и ФВ₂, токсинов Т-2 и НТ-2 составили – 0, 0005; 0, 005; 0, 05; 0, 01 и 0, 04; 0, 002 и 0, 005 мг/кг соответственно.

Показано, что содержание Т-2 токсина в контаминированных пробах не превышало ПДК (0, 1 мг/кг). Токсины Т-2 и НТ-2 были обнаружены в 14% и 16% проб, соответственно. Содержание токсина НТ-2, как правило, было выше, чем токсина Т-2. Установлено, что наиболее часто токсином Т-2 были загрязнены пробы кукурузы, овса и ячменя.

Частота и уровни загрязнения ДОН и ЗЛ в зерне пшеницы, ячменя, ржи и овса в период 2006-2008 гг. были низкими по сравнению с годами массовых эпифитотий. Частота обнаружения ДОН в зерне пшеницы составила 9%, ржи – 4%, ячменя – 0, 8%. Ни в одной из исследованных партий зерна овса и кукурузы ДОН не обнаружен. Контаминация зерна ЗЛ в эти годы была относительно высокой и варьировала от 4 до 40%. Рассчитанное суточное поступление ДОН на 1 кг массы тела человека в среднем по России варьировало от

0, 066 мкг до 0, 096 мкг. Подтверждено, что наибольшее количество образцов, загрязненных ДОН и ЗЛ, производится в Южном Федеральном округе. Выявлена высокая частота обнаружения ФВ₁ и ФВ₂ в зерне кукурузы – 61 и 31%, соответственно.

Особое внимание было уделено изучению загрязнения МТ продуктов детского питания на основе зерна, наиболее часто потребляемых детьми, включая продукты прикорма (сухие каши, мясо-, рыбо-растительные и фруктово-зерновые консервы), хлебобулочные изделия (печенье, хлеб), мукомольно-крупяные изделия (в том числе, кукурузные хлопья). Продукты детского питания исследовали на содержание МТ ОТА, ДОН, ЗЛ, ФВ₁ и ФВ₂.

Показано, что в среднем за весь период 2007 – 2009 г. г. ОТА был обнаружен в 6% из 314 образцов детского питания на зерновой основе. Наибольшая частота контаминации ОТА была отмечена в мукомольно-крупяных изделиях (25%), наименьшая - в кашах (6%). В продуктах прикорма ОТА наиболее часто обнаруживали в прикорме на основе гречневой муки (4 из 8 исследованных образцов), реже - на мультизерновой основе (8%), овса (5%), пшеницы (4%) и риса (1%).

За период исследований ФВ₁ был обнаружен в 29% образцов детского питания на основе кукурузы в концентрациях от 0, 01 до 0, 35 мг/кг; ФВ₂ (0, 04 мг/кг) был выявлен только в 1 пробе. Установлена высокая частота загрязнения ФВ₁ (41%) кукурузных хлопьев и (47%) продуктов прикорма (каши) на кукурузной основе в низких концентрациях. В консервах, предназначенных для прикорма, частота обнаружения ФВ₁ составила 4 %.

ДОН и ЗЛ в продуктах детского питания не обнаружены.

Несмотря на обнаружение сравнительно невысоких уровней загрязнения МТ, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что проблема контаминации МТ продовольственного сырья и, особенно, продуктов детского питания остаётся важной и актуальной для России и требуют продолжения мониторинговых исследований в этой области.

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ НА БИОСИНТЕЗ МАКРОЦИКЛИЧЕСКИХ ТРИХОТЕЦЕНОВ У *DENDRODICHUM TOXICUM*

Зайченко А. М., Андриенко Е. В., Цыганенко Е. С.

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

Во многих фундаментальных процессах, которые изучаются на молекулярном уровне, металлы выступают как обязательные и необходимые компоненты, кофакторы. В настоящее время стало вполне очевидным, что нет ни одного важного процесса, ни одной физиологической функции, которые могли бы протекать в отсутствие того или иного металла. Тем не менее, роль отдельных металлов в различных процессах, механизм их стимулирующего или ингибирующего действия далеко не изучены.

Особый интерес вызывают исследования, имеющие отношение к изучению роли отдельных микроэлементов в биосинтезе вторичных метаболитов, в частности микотоксинов, поскольку они открывают перспективу направленного действия на этот процесс. Задача наших исследований состояла в том, чтобы из большого количества микроэлементов, играющих роль в жизнедеятельности грибов отобрать те, которые оказывают определенное влияние на биосинтез макроциклических трихотеценов (МЦТЦ).

В результате предварительного изучения для дальнейших исследований были отобраны молибден, цинк, марганец, кобальт, медь, бор и хром. Также предполагалось установить концентрации микроэлементов, оптимальные как для образования, так и для ингибирования синтеза МЦТЦ. Исходными концентрациями элементов служили 0,1 и 1,0 мг/л, а также отобранные из расчета их влияния на максимальный биосинтез МЦТЦ.

В результате проведенных исследований были установлены значимые для биосинтеза МЦТЦ элементы и их концентрации, обеспечивающие максимальный выход и продуктивность процесса токсинообразования. Ионы цинка, марганца и бора в концентрациях 0,1; 0,2 и 0,5 мг/л обеспечивали усиление биосинтеза МЦТЦ на 36 – 150 %. Ионы молибдена, кобальта, меди и хрома в различной степени ингибировали этот процесс. Оптимальные концентрации микроэлементов для максимального роста *D. toxicum* и биосинтеза токсинов не совпадали; отдельные микроэлементы оказывали (иногда значительное) активирующее либо ингибирующее действие на рост гриба и синтез МЦТЦ.

Активирующая и ингибирующая роль отдельных микроэлементов в биосинтезе микотоксинов представляется особенно интересной в связи с содержанием их в природных субстратах, заселяемых токсинообразующими грибами. Особое внимание следует обратить на потенциальную опасность контаминации грибами кормов, в которые в качестве обязательных компонентов вводятся смеси различных микроэлементов (железа, марганца, меди, цинка, кобальта, йода).

Однако, с нашей точки зрения, концентрации данных элементов, используемые в качестве премиксов в комбикормах для различных возрастных и откормочных групп свиней, значительно превышают оптимальные для биосинтеза МЦТЦ, в связи с чем можно предположить определенную их «защищенность» от контаминации этими метаболитами. Все же, мы считаем, что эту проблему следует решать с учетом комплекса факторов при действенном санитарно-токсикологическом контроле, нуждающемся в надежных экспресс-методах.

КОНТАМИНИРОВАННОСТЬ КОРМОВ И МОЛОКА АФЛАТОКСИНОМ M_1 , В РАЙОНЕ ШИРАЗ, РЕСПУБЛИКИ ИРАН**Ерсали А., Григорян К. М.****Исламский университет, Шираз, Республика Иран****Ереванский государственный университет, Ереван**

Афлатоксин M_1 является основным микотоксином, который определяется в молоке и других молочных продуктах (Van Egmond, 1989). Указанный микотоксин выделяется с молоком животных, потребляющих корм, загрязненный афлатоксином B_1 (Vallone, 2006). Афлатоксин M_1 относится к канцерогенным соединениям из группы А, представляющим реальную опасность для здоровья человека, в соответствии с классификацией Международной организации IARC (IARC, 2002). В соответствии с Европейским законодательством предельно допустимое количество афлатоксина M_1 в молочных продуктах, предназначенных для человека, составляет 0.05 мкг/кг (EFSA, 2005; Reg. EC 1831/2003). В большинстве других стран этот показатель соответствует 0.5 мкг/кг (FDA, 2004).

Проанализировано 180 обр. сырого и 120 обр. пастеризованного молока, отобранных в разные сезоны года, из района Шираз Республики Иран. Одновременно микотоксикологическому анализу были подвергнуты 128 образцов комбикормов и их ингредиентов, которыми кормили молочный скот.

Определение афлатоксинов проводилось методами хроматографического (ТСХ и ВЭЖХ) и иммуно-ферментного анализов (ELISA).

В 38.03% сырого и 14.4% пастеризованного молока, из общего числа проанализированных проб, определены количества афлатоксина M_1 , превышающие ПДК (0.5 мкг/кг). Изучено влияние режимов пастеризации (время и температура) на содержание микотоксина в готовом продукте.

В 35.4% кормов количество афлатоксина B_1 превышало предельно допустимые концентрации (20 мкг/кг). Из кормов, с высоким уровнем загрязнения афлатоксином B_1 , изолированы активные продуценты афлатоксинов из секции *A. Flavi*. При анализе воздуха складских помещений также выявлены высокотоксичные штаммы *A. nomius*, которые продуцировали наряду с афлатоксином B_1 , афлатоксины M_1 и M_2 . Выявлены основные компоненты комбикормов, которые в большей степени способствуют биосинтезу афлатоксина B_1 .