

Статья

Гидрофобизированный обращенно-фазовый адсорбент для защиты молочного скота от липофильных токсинов из рациона. Эффективность *in vitro* и *in vivo*.

Александр Сотниченко,* Евгений Панцов, Дмитрий Шинкарёв, Виктор Оханов

Научно-производственный центр «Фокс и Ко». 117149, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8. www.fox-rpc.com, company@fox-rpc.com

*Корреспонденция: sotnichenko@fox-rpc.com; +7-499-317-20-37, +7 916-106-76-60

Получено: 21 марта 2019; Принято: 30 апреля 2019; Опубликовано: 07 мая 2019

Реферат: Устойчивый рост воспалительных заболеваний вымени у молочного скота заставляет искать причины этого явления в растущем химическом загрязнении окружающей среды и кормов. На этом основании проведен анализ степени полярности трёх групп токсических примесей, повсеместно присутствующих в кормах для молочного скота, микотоксинов (МКТ), полиароматических углеводородов (ПАУ) и стойких органических загрязнителей (СОЗ). Установлено, что 46% из изученных МКТ ($n = 1500$) и 100% из изученных ПАУ ($n = 45$) и СОЗ ($n = 55$) относятся к липофильным соединениям, склонным к биоаккумуляции. Проведена сравнительная оценка сорбционной способности четырех адсорбентов различной природы по отношению к простейшему ПАУ, нафталину и липофильному эстрогенному микотоксину, зеараленону. Наивысшую эффективность в этих экспериментах продемонстрировал обращенно-фазовый полиоктилированный полисиликатный гидрогель (ПОПСГ). Применение ПОПСГ в стаде лактирующих коров позволило значительно снизить перенос в молоко альдрина, дильдрина и гептахлора, типичных СОЗ из «грязной дюжины». Рассматривается актуальность защиты основных функциональных систем организма животных от повреждающего действия неполярных токсинов из кормов с помощью неполярных адсорбентов и концепция оценки эффективности различных кормовых адсорбентов для молочного скота по их влиянию на уровень соматических клеток в сборном молоке.

Ключевые слова: микотоксины; ПАУ; СОЗ; липофильность; Log P; крупный рогатый скот; мастит; ryegrass staggers; адсорбент; биоаккумуляция

1. Введение

Известно, что воспалительные заболевания молочной железы, которые в зависимости от степени выраженности, обозначаются обычно как субклинический или клинический мастит, наносят серьезный урон сельскому хозяйству [1,2]. Ежегодные экономические потери, которые вызывают эти заболевания молочного скота, в мировом масштабе исчисляются десятками миллиардов долларов. К настоящему времени достаточно хорошо установлены и изучены патогены, которые провоцируют развитие мастита и факторы от которых зависит чувствительность животных к этой патологии [2-7]. Среди них обычно

рассматривают свойства, присущие самим животным, такие как вид животного, генетические особенности [8], продуктивность, возраст, количество отелов/лактаций, строение вымени [9, 10] и др., а также внешние факторы, связанные с условиями содержания, ухода, доения и кормления животных [1-3,9-13].

Сегодня можно сделать вывод о том, что несмотря на значительный прогресс, который был достигнут в селекционной генетике и технологиях содержания, ухода и доения животных, количество случаев зарегистрированного мастита постоянно возрастает. Причем, в некоторых регионах наблюдается значительное увеличение частоты случаев мастита, особенно в его субклинической форме (до 60% поголовья) [2,11]. По-видимому, это может быть связано с постоянным увеличением загрязнения окружающей среды, что не может не сказываться на качестве кормов, применяемых в молочном животноводстве.

Можно высказать предположение, что при несомненных достижениях генетики и применении самых передовых технологий молочного производства в настоящее время всё большее, если не основное, влияние на состояние здоровья и продуктивность КРС и потребительские свойства молока начинает приобретать качество кормов, применяемых в молочном животноводстве. Практика показывает, что основу рационов для домашней птицы, рыбы и свиней составляют комбикорма на основе зернового сырья с различными добавками, а рацион молочного скота состоит в основном из травянистых растений с небольшими добавками концентратов. Поэтому корма для домашней птицы, рыбы и свиней содержат в основном токсины, характерные для зернового сырья, в основном микотоксины, а корма для молочного скота содержат токсины, характерные для массы зеленой травы. Травяная масса, в дополнение к микотоксинам, о чем будет более подробно сказано ниже, всегда содержит полиароматические углеводороды (ПАУ) и стойкие органические загрязнители (СОЗ) в качестве примесей. По этой причине общепринято считать, что молочный скот потребляет более токсичные корма, чем домашняя птица или свиньи. Поскольку основу рациона молочных коров в летний период составляют зеленые корма, а в зимний — силосы, концентраты, сенажи и солома, то содержащиеся в этих кормах токсины могут со временем оказывать негативное влияние на общее состояние здоровья животных, на возможности нервной, иммунной, эндокринной и пищеварительной систем, на количество соматических клеток (КСК) в молоке, бактериальную обсеменённость молока и уровень удоев.

В данной работе мы будем использовать термины, которые описывают свойства химических веществ по отношению к их окружению. Необходимо учитывать, что микотоксины, могут быть отнесены либо к полярным веществам, которые обладают хорошей растворимостью в воде, поэтому называются гидрофильными, либо к неполярным веществам, которые предпочтительно сосредотачиваются в средах с низкой диэлектрической проницаемостью. Такие вещества обычно обозначаются терминами: неполярные, липофильные или гидрофобные. Но, поскольку, среди неполярных веществ присутствуют соединения с полярными группировками, которые обеспечивают наличие в молекуле дипольного момента, то для обозначения веществ с $\text{Log } P_{ow} > 3$ чаще будут использоваться термины: липофильный или гидрофобный.

Основными токсическими компонентами кормов для КРС принято считать микотоксины (МКТ) — вторичные метаболиты токсикогенных микроскопических грибов [14-19]. МКТ представляют собой весьма широкий круг различных по составу, строению и биологическим свойствам химических соединений, которых объединяет единственный признак — источник происхождения.

По мере развития аналитических методик и оснащения профильно специализированных и исследовательских лабораторий количество контаминированных видов кормов, а также виды и количество МКТ, определяемых в кормах, постоянно возрастают [20-28]. Другими

словами, чем больший спектр МКТ анализируется в кормах, тем большая доля кормов оказывается загрязнённой этими соединениями. В настоящее время всё больше специалистов склоняются к мнению, что практически все корма содержат МКТ. Вопрос только в их номенклатуре и концентрации. На основании данных, приведенных в работах по оценке загрязнения образцов травы и силоса из разных стран различными видами микроскопических грибов-продуцентов, принадлежащих к более чем 20 родам [20,23,26,29], вполне естественно ожидать, что эти образцы могут содержать в разных количествах до 500 и более разных МКТ, определение которых в полном объёме не представляется возможным.

Опасность наличия МКТ в кормах для КРС и других сельскохозяйственных животных кроме вреда для здоровья поголовья и снижения продуктивности [30,31] заключается ещё и в риске их переноса в животноводческую продукцию — прежде всего в молоко [32-35], яйца и мясо [36-39] и включения таким образом в пищевые цепи человека [40-42]. В первую очередь это относится к неполярным токсинам, способным к биоаккумуляции [43].

Кроме МКТ, как известно, корма для КРС практически всегда содержат ещё две группы токсических соединений, которые в результате природных явлений и деятельности человека, получили широкое распространение в окружающей среде любого региона. Речь идет о полиароматических углеводородах (ПАУ), например, нафталине, бензпирене, хризене, бензантрацене и др. и стойких органических загрязнителях (СОЗ), таких как альдрин, диэльдрин, гептахлор, эндрин, ДДТ, гексахлорциклогексан, полихлорированные бифенилы, диоксины, фураны и др. [37,44,45].

Установлено, что ПАУ и СОЗ подобно липофильным МКТ также способны к биоаккумуляции [46] и переносу в молоко [37,47-50] в количествах до 80% от полученной дозы из корма, особенно СОЗ. Кроме того, ПАУ вместе с МКТ, но, в отличие от СОЗ, эволюционно относятся к типичным субстратами для системы метаболизма ксенобиотиков цитохрома Р-450 позвоночных и своим наличием в кормах создают дополнительную нагрузку на систему детоксикации печени, снижая её возможности по обезвреживанию других токсичных ксенобиотиков, в первую очередь — МКТ.

Существует точка зрения, что не только МКТ могут синергически усиливать действие друг друга [51,52], но и синергически взаимодействовать с ПАУ и СОЗ. Было показано, например, что некоторые СОЗ, например, 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-р-диоксин, или просто диоксин, способен в несколько раз усиливать токсическое действие Т-2 токсина на кроликов [53]. В связи с этим, достаточно сложно оценить уровень синергического взаимодействия токсинов и его последствия для организма при одновременном наличии в кормах нескольких десятков или сотен разных МКТ, ПАУ и СОЗ, даже в низких концентрациях. Поэтому в современном животноводстве крайне необходимо использование эффективных средств защиты животных от вредного влияния токсинов, содержащихся в кормах.

Для снижения токсической нагрузки контаминированных кормов кроме механических, химических и физических методов борьбы с плесневыми грибами часто применяют адсорбенты. Они используются в виде кормовых добавок для удаления МКТ из желудочно-кишечного тракта животных. Свойства и эффективность применения адсорбентов в животноводстве описаны в многочисленных статьях и обзорах [54-61]. Большинство из применяемых кормовых адсорбентов проявляют достаточно высокую эффективность в свиноводстве и птицеводстве при наличии в кормах по большей части полярных микотоксинов. Но, как показывает практика, их эффективность в отношении липофильных токсинов значительно ниже. Поэтому весьма насущной представляется проблема разработки и применения в молочном животноводстве адсорбентов, которые способны выводить из организма животного также и липофильные токсины, такие как гидрофобные микотоксины, ПАУ и СОЗ.

В данной статье после проведения анализа свойств трёх основных видов контаминантов кормов для КРС в терминах полярности, микотоксинов, ПАУ и СОЗ, продемонстрирована эффективность нового адсорбента на основе обращённо-фазового полиоктилированного полисиликатного гидрогеля (ПОПСГ) по связыванию липофильных токсинов *in vitro* и снижению переноса в молоко некоторых СОЗ *in vivo*. Приводятся рекомендации по борьбе с неполярными токсинами из кормов и оптимизации процесса выбора адсорбентов для применения в молочном животноводстве.

2. Результаты

2.1. О полярности микотоксинов

На рисунке 1 приведены данные о коэффициентах распределения 1500 МКТ и других экстрактов грибов и некоторых бактерий, которые широко распространены в почвах и могут содержаться в кормах для КРС, представленные в виде гистограммы. По оси абсцисс на графике отложены значения коэффициентов распределения с инкрементом, равным 0,5, а по оси ординат – количество МКТ, имеющих значение этого параметра в указанном диапазоне.

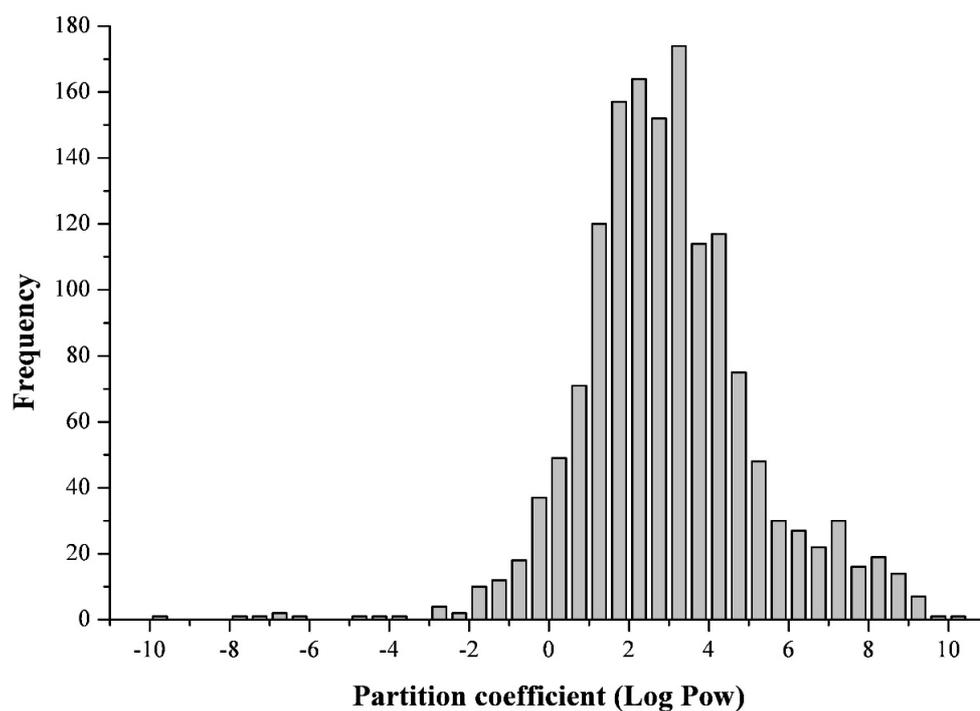


Рисунок 1. Распределение некоторых микотоксинов по их полярности (липофильности)

Такой график можно назвать “профилем липофильности” для данной выборки МКТ. Данные о расчётных значениях LogPow (XLog P3-AA [62]) для этих соединений представлены в приложении (Таблица С1). Члены таблицы расположены по мере возрастания значения коэффициента распределения (Log Pow) с инкрементом 0,1. Алфавитная сортировка в названиях веществ соблюдается в пределах одинаковых значений этого параметра.

На основании данных таблицы С1 следует, что 90% всех представленных микотоксинов имеют коэффициенты распределения в пределах от -0,2 до + 7,2. Вся эта выборка в

соответствии с коэффициентами распределения её компонентов характеризуется следующими параметрами: среднее – 2.98, медиана – 3.02, минимальное – -10.0, максимальное – +10.1. Также ясно, что из всего массива, содержащего 1500 соединений, доля полярных веществ ($\text{Log Pow} < 1$) составляет 213 веществ или 14,2%, доля умеренно гидрофильных/липофильных ($1 \leq \text{Log Pow} < 3$) составляет 592 вещества, или 39,5%, а липофильные соединения ($\text{Log Pow} \geq 3$) представлены 695 веществами, что составляет 46,3%. Следует отметить, что в процессе формирования этой базы данных и при увеличении случайным образом количества МКТ с 200 до 1500 членов, относительное содержание неполярных токсинов возросло с 25% до 45% при увеличении количества МКТ до 400, а далее оставалось практически постоянным на достигнутом уровне. Таким образом, можно констатировать, что более 45% из изученных в работе МКТ представлены неполярными веществами. Эти данные заслуживают особого внимания, поскольку, как известно, неполярные вещества представляют дополнительную угрозу для животных из-за их способности к биоаккумуляции [43].

2.2. О полярности полиароматических углеводов и стойких органических загрязнителей.

Известно, что практически все корма для молочного скота, особенно на основе травянистых растений, содержат ещё два вида примесей – ПАУ и СОЗ. Анализ базы данных PubChem [63] показал, что, в отличие от МКТ, все 100% ПАУ ($n = 45$) и СОЗ ($n = 55$) относятся к неполярным веществам (см. Табл. С2 и С3, соответственно). Так, самый полярный из ПАУ – нафталин, характеризуется $\text{Log Pow} = 3,3$, а наиболее полярный из СОЗ – эндрин, имеет коэффициент распределения $\text{Log Pow} = 3,7$. Другие представители этих групп соединений обладают ещё более высокими значениями коэффициента распределения в диапазоне от 3,7 до 10,0. Это означает, что все они, как и неполярные МКТ, способны к биоаккумуляции, особенно СОЗ [46].

2.3. Сравнительная сорбционная ёмкость адсорбентов в отношении липофильных сорбатов.

На рисунке 2 представлены данные о сорбционной ёмкости четырех разных адсорбентов в отношении неполярного простейшего ПАУ, нафталина ($\text{Log Pow} = 3.3$) и липофильного эстрогенного микотоксина, зеараленона ($\text{Log Pow} = 3.6$), а) и б) соответственно.

Были использованы адсорбенты разной природы и полярности. Адсорбент №1 был выбран среди полярных алюмосиликатных адсорбентов, №2 состоит из достаточно полярных клеточных стенок дрожжей, №3 – активированный уголь (гидрофобный сорбент), а адсорбент №4 представляет собой гидрофобизированный обращённо-фазовый адсорбент на основе октилированного полисиликатного гидрогеля [24]. За 100% принимали сорбционную ёмкость наиболее эффективного адсорбента. Можно видеть, что неполярные адсорбенты (№3 и 4) значительно превосходят полярные (№1 и 2) по способности связывать липофильные сорбаты. Можно также отметить, что по сорбционной ёмкости адсорбент №4 существенно превосходит и активированный уголь, о чём упоминалось выше. По этой причине его ёмкость в данном эксперименте была принята за 100%.

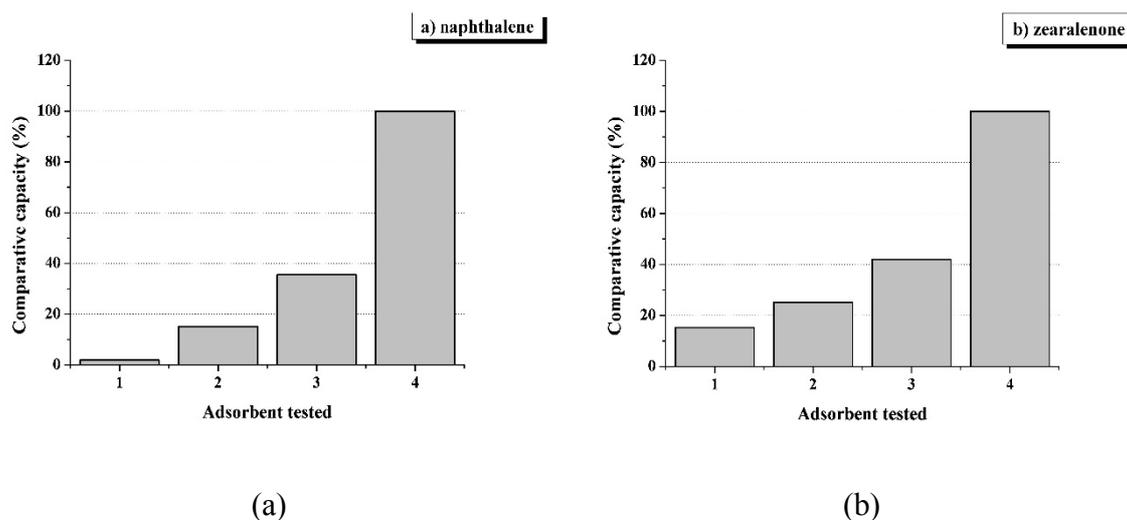


Рисунок 2. Сравнительная емкость адсорбентов различной природы по отношению к липофильным сорбатам, нафталину (а) и зеараленону (б).

2.4. Влияние ПОПСГ на перенос хлорированных пестицидов в молоко.

Как уже упоминалось, СОЗ в наибольшей степени склонны к переносу в молоко. Эта способность зависит от состава и свойств СОЗ, но, как установлено, она существенно выше, чем у МКТ и ПАУ. О причинах этого явления будет сказано далее. В таблице 1 приводятся данные о влиянии адсорбента №4 (ПОПСГ) на концентрацию некоторых хлорированных пестицидов из «грязной дюжины», а именно, альдрина, диэльдрина и гептахлора, в сборном молоке от одной из молочных ферм северо-восточного района Калужской области Российской Федерации.

Таблица 1. Концентрация хлорированных пестицидов в сборном сыром молоке.

Вещество	Концентрация пестицида (мкг/г)	
	Контрольная группа	Экспериментальная группа
Альдрин	10,6	н.о.*
Диэльдрина	5,70	н.о.
Гептахлор	5,85	н.о.

* - н.о. (не определяется) означает, что концентрация вещества в образце не превышает пределов детекции аналитического метода (2 мкг/кг).

Можно видеть, что применение ПОПСГ в стаде экспериментальной группы, состоящей из 65 голов, в течение 40 дней позволяет значительно снижать перенос в молоко и содержание в нем указанных хлорированных пестицидов.

3. Обсуждение

3.1. О полярности микотоксинов в кормах.

Существует множество типов классификаций микотоксинов по различным признакам, но для нашего рассмотрения наиболее значимыми представляются два наиболее общих типа классификаций. Первый из них опирается на экологические ниши грибов производителей. Микотоксины в кормах для КРС в зависимости от экологической ниши источника происхождения условно подразделяют на «полевые», те которые образуются

фитопатогенными грибами в период роста и созревания травянистых растений, зерновых и других кормовых культур [64-67], «пастбищные», которые производятся эндофитными грибами-симбионтами в период активной вегетации и плодоношения некоторых пастбищных растений в теплое время года [23,68-72] и «складские», которые образуются во время хранения зараженной плесенью растительной продукции на складах в ненадлежащих условиях [26,54,65,67,73]. Следует отметить, что такое деление не является абсолютно строгим, поскольку некоторые виды грибов из разных родов могут проявлять свойства, не характерные для своего рода - «полевых», «пастбищных» или «складских».

Второй общий тип классификации микотоксинов опирается на их физико-химические свойства [24]. В качестве основного критерия отбора выбирается одна из фундаментальных характеристик, присущая всем без исключения низкомолекулярным органическим веществам – степень полярности/липофильности соединения, которая может быть количественно описана с помощью коэффициента распределения химического вещества в системе «октанол/вода», выражаемого в виде десятичного логарифма (Log Pow). “Pow” означает «распределение октанол/вода» (в английском варианте - “Partition octanol/water”) [74,75]. Далее, принимая во внимание тот факт, что в таблицах этой статьи приведены расчетные значения для коэффициентов распределения (XLogP3-AA) [62], для простоты в тексте мы будем использовать обозначение - Log Pow. Количественная оценка, присущая данному способу, имеет определённые преимущества перед другими видами классификации МКТ. В рамках такого подхода все МКТ по степени полярности / гидрофильности / липофильности / гидрофобности можно в соответствии с общепринятой схемой условно, но однозначно разделить всего на три группы: полярные (гидрофильные) ($\text{Log Pow} < 1$), умеренно гидрофильные/липофильные ($1 \leq \text{Log Pow} < 3$) и липофильные (гидрофобные) ($\text{Log Pow} \geq 3$). Поэтому любой МКТ из “полевых”, “пастбищных” или “складских”, независимо от экологической ниши и видовой принадлежности продуцента и биологических свойств вещества, может оказаться в любой из групп полярности в зависимости только от его химического состава и строения молекулы. Такой подход к систематизации МКТ не связан с другими способами классификации МКТ, но может оказаться наиболее полезным при разработке адсорбентов для борьбы с этими токсинами.

Как уже упоминалось в результатах исследования, доля липофильных микотоксинов из выборки в 1500 единиц (Таблица С1) составила 46%. Подобное распределение МКТ по степени полярности наблюдается и в реальных кормах для КРС. В графическом виде это можно проиллюстрировать на основании анализа данных, представленных в масштабном исследовании о распространенности 139 индивидуальных МКТ и других грибных метаболитов в 86 образцах различных кормов для КРС и их компонентов, полученных из разных стран [26]. МКТ, которые количественно определяли в этой работе, значительно различаются по степени липофильности в диапазоне коэффициента распределения (Log Pow) от -2.3 (деоксиниваленол-3-глюкозид) до +8.6 (калфостин С). В работе было также отмечено, что большинство образцов кормов содержали от 25 до 40 разных МКТ. На графике (рис. 3) представлены данные о 22 разных МКТ, которыми, как было отмечено авторами исследования, были контаминированы более 60 % всех исследованных образцов кормов. По оси X отмечены индивидуальные метаболиты, расположенные в соответствии со степенью их липофильности, или Log Pow, а по оси Y – количество образцов корма, контаминированных этим МКТ, в процентах от общего числа исследованных образцов. Расчёт показывает, что четыре представителя МКТ (деоксиниваленол-3-глюкозид, ниваленол, деоксиниваленол и монилиформин) составляют 18.2% и относятся к полярным (гидрофильным) токсинам ($\text{Log Pow} = -2.3 - 1.0$), семь МКТ (бrevianамид F, эргометрин, триптофол, тентоксин, тенуазоновая кислота, эмодин и алтернариол) составляют 31.8% и их можно отнести к умеренно

липофильным токсинам, а остальные одиннадцать МКТ (алтернариола метиловый эфир, кулморин, ауурофузарин, зеараленон, апицидин, эквисетин, энниатины А, А1 и В, В1 и боверицин) составляют оставшиеся 50% и относятся к липофильным токсинам ($\text{Log Pow} = 3.2 - 8.4$).

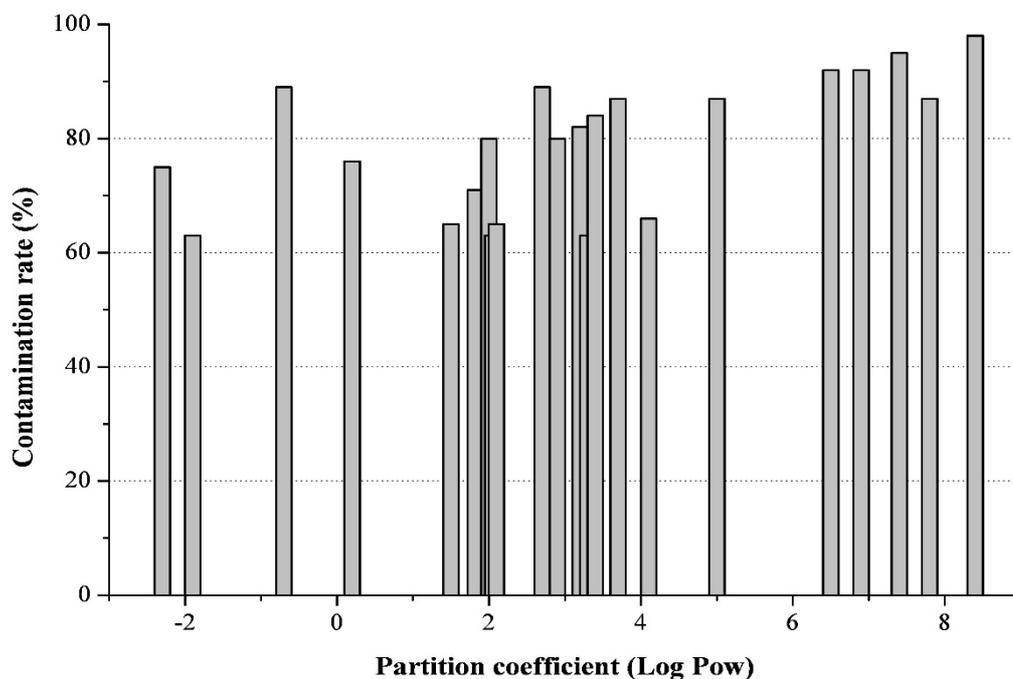


Рисунок 3. Загрязнение кормов молочного скота различными микотоксинами (по данным [26]).

При этом степень контаминирования кормов наиболее гидрофобными МКТ – энниятинами и боверицином ($\text{Log Pow} = 6.5 - 8.4$), как было установлено в работе, составляла от 87 до 98%. Опасность наличия этих МКТ в кормах для КРС заключается в том, что они, в виду высокой липофильности, способны к биоаккумуляции и, несмотря на сравнительно невысокую острую токсичность для позвоночных, они обладают выраженными антибиотическими свойствами против широкого круга микроорганизмов и могут модифицировать микрофлору рубца, нарушая таким образом полноценное пищеварение жвачных [76–79]. В добавок к антибиотическим свойствам, энниатины и боверицины обладают цитотоксическим действием на клетки млекопитающих [80,81] и способны угнетать иммунную систему [82–84].

Еще более высокое содержание липофильных МКТ в кормах можно отметить при анализе степени загрязнения образцов разнотравья ($n = 106$) на умеренных пастбищах провинции Чако в Аргентине и количественного определения в них 77 МКТ [20]. Среди всех микотоксинов, которые были определены в исследовании, нами были отмечены те из них, степень загрязнения которыми превышала 60% всех образцов ($n = 21$). Восемь из них или 38% были умеренно липофильными токсинами ($\text{Log Pow} = 1.0 - 2.9$), а тринадцать из них, или 62%, представляли собой липофильные МКТ ($\text{Log Pow} = 3.0 - 8.4$). Загрязнение образцов травы полярными токсинами было значительно ниже, чем 60%. Среди умеренно липофильных токсинов загрязнение образцов эмодином, альтернариолом и моноцеринном доходило до 100%, тогда как загрязнение такими липофильными токсинами, как ауурофузарин, стеригматоцистин, хризофанол, эквисетин, скирин и боверицин, варьировало от 90 до 100%.

Уместно отметить, что широко известные «пастбищные» эндофитные токсины – лолитремы ($n = 11$) [70], которые вызывают так называемое «райграссовое шатание» (ryegrass steggens), также относятся к липофильным микотоксинам ($\text{Log Pow} = 3,9 - 6,0$), как и большинство других треморгенных МКТ (см. Табл. С1).

По этой причине мы полагаем, что наибольшую опасность для поголовья молочных коров представляют именно липофильные токсины. Гидрофильные микотоксины, как и другие полярные токсины, обычно хорошо растворяются в воде и могут выводиться из организма с мочой, тогда как липофильные токсины не выводятся с мочой и обычно накапливаются в жировой ткани. Поэтому они, вероятно, представляют большую угрозу, чем гидрофильные токсины.

В настоящее время проводится работа по приведению в более полное соответствие грибов-продуцентов и их метаболитов, представленных в Таблице С1. По её завершению будут представлены данные о полярности микотоксинов и других метаболитов, которые производятся микромицетами той или иной родовой принадлежности. На данном этапе проведения этой работы уже становится очевидным, что доля неполярных метаболитов, которые производятся «пастбищными» эндофитными грибами из родов *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Claviceps*, *Emericella* и *Phoma* в целом заметно выше, чем относительное количество липофильных метаболитов, производимых «полевыми» грибами из родов *Alternaria* и *Fusarium* или «складскими» грибами из родов *Aspergillus* и *Penicillium*. На основании обсуждаемых данных можно предположить, что эндофитные грибы в целом продуцируют более липофильные микотоксины, чем фитопатогенные или сапрофитные. Также большой интерес представляет степень полярности микотоксинов с высокой фунгицидной активностью, производимых эндофитными грибами. Этот интерес в значительной степени поддерживается данными об ингибировании развития *Aspergillus flavus* и *Fusarium verticillioides* при выращивании кукурузы метаболитами эндофитного гриба *Acremonium zeae*. Авторы показали, что два антибиотика, выделенных из культуры *Acremonium zeae*, пирроцидины А и В, обладают, как было установлено, выраженной антибактериальной и противогрибковой активностью в отношении *Aspergillus flavus* и *Fusarium verticillioides* [85]. В этом случае известно и следует подчеркнуть, что оба пирроцидина являются довольно гидрофобными соединениями с одинаково высокими значениями коэффициентов распределения ($\text{Log Pow} = 5,5$) [63].

Эти данные согласуются с результатами работы по исследованию загрязнения 5 видов травянистых пастбищных растений (овсяница, фестулолиум, тимофеевка, райграсс многолетний, ежа сборная), их смеси с клевером и смеси тимофеевки с люцерной микромицетами, в первую очередь эндофитными, и их 16 метаболитами перед первым и вторым укусами кормового сырья [23]. Работа проводилась в северо-западном регионе Российской Федерации. Перед первым укусом среди лидеров по количеству колониеобразующих единиц на 1 г сырья (КОЕ/г) были отмечены грибы родов *Cladosporium*, *Alternaria* и *Phoma*. Причем, все три вида сырья были контаминированы в близкой степени. Перед вторым укусом, урожай от которого обычно составляет основу «зимнего» рациона молочного скота в России, в составе лидирующей группы были отмечены изменения. Грибы рода *Acremonium* заменили род *Alternaria* в первой тройке, а степень контаминирования растений грибами (КОЕ/г) также изменилась. В травяной смеси этот показатель вырос в 1,86 раза, в клеверно-травяной смеси — в 15,9 раз, в основном за счет *Cladosporium*, *Acremonium* и *Phoma*, а в смеси тимофеевки с люцерной контаминация снизилась в 2,26 раза. По мере убывания показателя суммарного КОЕ/г виды тестируемого корма можно распределить в следующем порядке: клеверно-травяная смесь (КОЕ = 552533), травяная смесь (КОЕ = 80360) и смесь тимофеевки с люцерной (КОЕ = 16667). Следует отметить, что, как упоминалось

выше, среди метаболитов «лидирующей» тройки грибов на долю неполярных токсинов приходится около 70%. На основании этих данных можно констатировать, что люцерна представляется более предпочтительным видом бобовых при использовании в травяных смесях по сравнению с клевером.

3.2. Другие неполярные контаминанты кормов для крупного рогатого скота

Как уже упоминалось, корма для КРС кроме микотоксинов практически всегда содержат ещё ПАУ и СОЗ. Наибольшая степень биоаккумуляции среди этих групп химических соединений характерна для СОЗ [46]. Дело в том, что СОЗы представляют собой эволюционно нетипичные субстраты для системы метаболизма ксенобиотиков семейства цитохромов Р-450 печени позвоночных, поскольку до начала масштабной промышленной деятельности человека в XX веке они в природе практически не встречались, и скорость их метаболизма в этой системе, в отличие от ПАУ или МКТ, крайне низка и всегда обратно пропорциональна содержанию атомов хлора или брома, в их молекулах [86-88]. Это может быть связано с тем, что отрицательные индукционные эффекты атомов галогенов (фтор, хлор, бром) в молекуле ароматического соединения могут снижать плотность электронного облака между соседними атомами углерода (порядок связи). Поэтому скорость окисления таких «обедненных» электронами связей цитохромами семейства Р-450 значительно снижается при увеличении степени замещения атомов водорода на хлор или бром в молекулах типичных СОЗ [89]. Определенный вклад в трудности метаболизма этих соединений вносят, как принято считать, также и стерические препятствия, которые создаются более объемными по сравнению с атомами водорода заместителями (хлор и бром). Поэтому СОЗ в значительной степени аккумулируются в жировой ткани и переносятся в продукты животноводства, о чём упоминалось выше.

3.3. Использование адсорбентов для снижения токсической нагрузки кормов

Изучение работ и обзоров по применению кормовых адсорбентов для защиты животных от токсинов из кормов позволяет заключить, что большая масса адсорбентов, которые предлагаются на рынках и используются на практике, представляют собой два основных типа. К первому из них принадлежат дешевые природные минералы, в большинстве случаев различные глины, построенные из силикатов или алюмосиликатов и их комбинаций, добываемые карьерным способом, и не требующие особых затрат на их производство. Ко второму более дорогому типу адсорбентов для микотоксинов относятся клеточные стенки дрожжей и комбинированные продукты на их основе, которые представляют собой переработанный побочный продукт производства пива и крепких алкогольных напитков.

В качестве примера успешного применения кормовых добавок-адсорбентов для снижения токсической нагрузки МКТ, содержащихся в кормах, можно привести афлатоксин В1 — высокотоксичный умеренно липофильный микотоксин ($\text{Log } P_{ow} = 1,6$), продуцируемый грибами рода *Aspergillus*. Именно с ним связано начало планомерного изучения МКТ после отравления большого стада молодых индеек партией арахисового шрота, содержащей афлатоксин В1 в значительных количествах [14-16]. Афлатоксины из-за своей широкой распространенности в кормах в областях с теплым климатом, высокой токсичности и канцерогенности все эти годы, начиная с 60-х годов двадцатого века, являются наиболее пристально изучаемыми и наиболее изученными микотоксинами. По этой причине применение многих адсорбентов МКТ было направлено на удаление в основном афлатоксина В1 из желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных. Действительно, в многочисленных исследованиях, результаты которых обсуждаются в обзорах [54,57,59], была продемонстрирована достаточно высокая эффективность традиционных алюмосиликатных

адсорбентов или адсорбентов из клеточных стенок дрожжей по уменьшению токсических эффектов этого МКТ и снижению степени переноса его основного метаболита афлатоксина М1 в молоко [32,90,91].

Однако, эффективность этих адсорбентов по отношению к менее полярным МКТ, таким как зеараленон (ЗЕА) (Log Pow = 3,6) или охратоксин А (Log Pow = 4,7), была, как отмечалось, существенно ниже [54,56-61]. ЗЕА в силу своих липофильных свойств и значительного отрицательного влияния на процессы воспроизводства фермерских животных во многих исследованиях выступает в качестве эталона для оценки эффективности применения кормовых адсорбентов. Так в работе, в которой *in vitro* оценивали степень связывания ЗЕА с 27 адсорбентами от разных производителей, приобретенных на рынках Бельгии и Нидерландов, при трех значениях рН (2,5; 6,5; 8,0), которые имитируют значения рН в разных отделах пищеварительного тракта жвачных, при весовом соотношении токсин : адсорбент = 1 : 20000, было показано, что даже при такой высокой нагрузке по адсорбенту измеримое связывание ЗЕА (более 70%) проявляли только 7 адсорбентов из 27, в числе которых были отмечены активированный уголь и добавки, содержащие гуминовые кислоты, но не алюмосиликаты или клеточные стенки дрожжей [56].

В работе по изучению эффективности сорбентов по связыванию ЗЕА в гастроинтестинальной модели [60] было отмечено, что единственным из применяемых сорбентов, который мог с измеримой емкостью связывать зеараленон, был активированный уголь, но только в концентрации от 0,5 до 2%. Такие концентрации адсорбентов в корме (иногда до 5%) часто используются в исследованиях по оценке их эффективности, но редко применяются в реальном животноводстве по экономическим причинам. Производители адсорбентов по экономическим соображениям обычно рекомендуют их применение в дозах от 0,1 до 0,2% от веса корма.

Было также отмечено, что традиционные алюмосиликатные сорбенты не способны защитить поголовье бройлеров от токсических эффектов полихлорированных пестицидов (типичные СОЗ) [36]. Отсутствие в доступной научной литературе сообщений о положительных примерах применения алюмосиликатных адсорбентов или адсорбентов из клеточных стенок дрожжей для купирования симптомов так называемого «ryegrass staggers», которые, как известно, провоцируются лолитремами, липофильными МКТ эндофитных грибов рода *Epichloë* [70], могут свидетельствовать о недостаточной эффективности таких сорбентов в данном конкретном случае. Чтобы бороться с этим явлением, обычно идут по пути выведения новых сортов трав с низким содержанием треморгенных токсинов. В большинстве случаев такие попытки заканчиваются неудачей. Другой, менее затратный подход - использование неполярных кормовых адсорбентов в этом случае представляется более перспективным.

3.4. Использование неполярных адсорбентов для снижения токсической нагрузки кормов.

В свете вышеизложенного встает насущная необходимость применения для удаления из кормов липофильных токсинов адсорбентов другого типа – неполярных. Такие адсорбенты в настоящее время представлены на рынке в основном двумя группами: 1) активированные угли и 2) холестирамин на основе пористого полистирола. Адсорбенты на основе холестирамина слишком дороги и поэтому в сельском хозяйстве не применяются. Адсорбенты на основе активированного угля не находят широкого распространения из-за низкой ёмкости и необходимости вследствие этого его включения в корма в высоких дозах. Часто это представляется экономически невыгодным. Но, тем не менее, в работах по оценке сравнительной ёмкости адсорбентов *in vitro*, было отмечено, что измеримую эффективность по зеараленону (липофильному токсину), как уже упоминалось, проявил только

активированный уголь, [60], а также некоторые сорбенты, содержащие гуминовые кислоты [56]. При изучении способности разных адсорбентов связывать *in vitro* высокотоксичный неполярный микотоксин охратоксин А ($\text{Log Pow} = 4,7$) при соотношении токсин:адсорбент = 1:500, сходные с активированным углём и холестирамином результаты продемонстрировали “Mico AD A-Z” (неожиданно), а также комбинированный адсорбент “Standard Q/FIS”, состоящий из смеси активированного угля, бентонита, экстракта дрожжей и алюмосиликатов [61].

Известен ещё один тип адсорбентов, которые специально разрабатывались для адсорбции и разделения неполярных веществ в высокоэффективной жидкостной хроматографии. Речь идёт о гидрофобизированных адсорбентах на полисиликатной основе. Хроматографические адсорбенты получают путем обработки специально синтезированных, промытых и высушенных частиц пористого силикагеля (SiO_2) подходящего размера с нужным диаметром пор в безводной среде различными реагентами для получения ковалентной связи между силикагелем и алкильным остатком ($-\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$), обычно содержащим от 4 до 18 атомов углерода. Эти адсорбенты, называемые обращённо-фазовыми (ОФ), обладают высокой гидрофобностью и способны в водной среде эффективно адсорбировать любые органические соединения с коэффициентом распределения больше нуля ($\text{Log Pow} > 0$).

Из теории и практики жидкостной хроматографии следует, что прочность связывания неполярных сорбатов с такими адсорбентами прямо пропорциональна величине коэффициента распределения сорбата в системе “октанол : вода” (Log Pow). ОФ-адсорбенты фактически представляют собой твёрдо-фазный вариант распределения органических веществ по липофильности в этой системе. В первую очередь это относится к адсорбентам, содержащим в качестве алкильного заместителя октильный остаток – C_8H_{17} .

Алюмосиликатные адсорбенты и клеточные стенки дрожжей достаточно давно применяются в практическом животноводстве, но до сих пор нет единой теории, которая могла бы объяснить механизмы связывания микотоксинов с их матрицами. В литературе обсуждается множество механизмов взаимодействия микотоксинов с этими матрицами, строятся сложные геометрические модели слоистого или пространственно-кристаллического строения алюмосиликатов и геометрического соответствия размеров молекул МКТ расстоянию между слоями филлосиликатов или размеру пустот в кристаллической решетке тектосиликатов, привлекаются практически все виды межмолекулярных взаимодействий, которые обсужаются в исследовательских статьях и обзорах [54-61]. Авторы этих исследований сходятся во мнении, что до сих пор не разработан единый подход к объяснению предпочтительного взаимодействия матриц с микотоксинами и правила, по которым можно было бы предсказать эффективность конкретного сорбента по отношению к тому или иному токсину. Подавляющее количество результатов с этими адсорбентами были получены и получают эмпирическим путём.

Модель гидрофобного взаимодействия растворенного вещества с неполярной ОФ-матрицей в водной среде выглядит несколько проще и опирается на единственную концепцию – минимизацию свободной энергии системы за счёт сохранения целостности структуры воды. Суть гидрофобного взаимодействия заключается в том, что неполярные вещества, находясь в водном растворе, не способны образовывать достаточного количества водородных связей с молекулами воды, нарушают её структуру, и системе энергетически выгоднее с помощью броуновского движения вывести такие вещества либо на поверхность раздела фаз, либо на любую гидрофобную поверхность внутри системы и таким образом восстановить структуру воды в системе. В этой модели прочность связывания неполярных веществ с ОФ-матрицей мало связана с размером и формой молекулы и прямо

пропорциональна степени липофильности вещества, или значению Log Pow [59,75, 92,93]. По этой причине данная концепция располагает возможностью прогнозирования. На практике это означает полную уверенность предсказания, что охратоксин А (Log Pow = 4,7), лолитрем В (Log Pow = 5,8), энниатин А1 (Log Pow = 7,4) или боверицин С (Log Pow = 9,5) будут в водной среде удерживаться неполярной ОФ-матрицей прочнее и более эффективно выводится из пищеварительного тракта, чем, например, афлатоксин А1 (Log Pow = 1,6) или зеараленон (Log Pow = 3,6), а ПАУ benzo[a]pyrene (Log Pow = 6,0) или СОЗы р,р-ДДТ (Log Pow = 6,9) или диоксин (Log Pow = 6,4) – прочнее, чем ПАУ нафталин (Log Pow = 3,3), или СОЗ эндрин (Log Pow = 3,7).

Следует отметить, однако, что ОФ-адсорбенты на полисиликатной основе, которые успешно зарекомендовали себя в жидкостной хроматографии, не могут столь же эффективно применяться в сельском хозяйстве в качестве кормовых добавок по крайней мере по двум причинам. Первая из них – высокая цена. Вторая причина кроется в относительно низкой ёмкости таких сорбентов в водной среде. Аналогичные свойства в водной среде проявляет и активированный уголь. В отличие от гидратированных алюмосиликатных адсорбентов и клеточных стенок дрожжей, ОФ-адсорбенты в виде сухого вещества (ксерогеля) и сухой активированный уголь не способны набухать в водной среде. В силу высокой гидрофобности внешней поверхности и поверхности внутренних капилляров эти вещества плохо или вовсе не смачиваются водой, а вода из-за высокого поверхностного натяжения и маленького диаметра внутренних пор не проникает внутрь частиц сорбента. В хроматографии эта проблема решается с помощью подвижных фаз, содержащих в разных пропорциях воду и органические растворители, которые лучше смачивают поверхность частиц ОФ-адсорбента, а смачивание внутренних пор достигается за счёт приложения к колонке с адсорбентом внешнего давления от 10 до 400 бар, которое позволяет преодолевать силы поверхностного натяжения и заполнить внутренние поры частиц подвижной фазой. Поэтому при атмосферном давлении в водной среде измеримой сорбционной ёмкостью может обладать только внешняя поверхность ОФ-адсорбентов и активированного угля, величина которой будет зависеть от размера частиц.

Недавно появились сообщения об использовании в сельском хозяйстве обращенно-фазового полисиликатного сорбента, изготовленного по другой технологии [24,94]. Этот адсорбент выпускается в виде частично гидрофобизированного полисиликатного гидрогеля, содержащего гидрофобные октильные группы, ковалентно связанные с гидратированной нерастворимой полисиликатной матрицей. Поскольку данный адсорбент производится в водной среде и представляет собой гидрогель, он не требует времени на набухание, изначально хорошо смачивается слюной, начинает «работать» во рту животных и способен более эффективно защищать от действия токсинов ротовую полость, пищевод и рубец.

Этот ОФ-адсорбент на основе полиоктилированного полисиликатного гидрогеля (ПОПСГ), который на рисунке 2 был обозначен №4, продемонстрировал достаточно высокую эффективность *in vivo* в молочном животноводстве [95]. Применение данного адсорбента в стаде Голштино-Фризских лактирующих коров приводило к значительному снижению КСК и к повышению удоя по сравнению с контрольной группой за 40 дней. При этом скорость и степень снижения КСК в молоке были выше [95], чем наблюдавшиеся при применении в сходных условиях других “традиционных” адсорбентов [65, 90, 91, 96, 97]. Несмотря на этот факт, окончательные выводы о степени эффективности применения того или иного адсорбента можно сделать только после проведения совместных сравнительных испытаний адсорбентов в одинаковых условиях и на конкретной кормовой базе.

В качестве ещё одного примера успешного применения неполярных сорбентов *in vivo* можно привести данные об использовании активированного угля и гуминовых кислот для контроля *Clostridium botulinum* у молочных коров [98].

Можно предположить, что в настоящее время особенно насущным становится контроль за неполярными МКТ, ПАУ и СОЗ, поскольку они лишь в незначительной степени сорбируются “традиционными” адсорбентами МКТ. В то же время, именно неполярные токсины обладают способностью к биоаккумуляции, и их концентрация в жировой ткани и степень влияния на состояние здоровья животных и переноса в молоко и другую продукцию животноводства может значительно увеличиваться при длительном употреблении кормов даже с низким уровнем контаминации. При этом необходимо учитывать кинетические параметры ферментативных систем системы детоксикации печени позвоночных. Можно предположить, что липофильные токсины, которые присутствуют в кормах в низких концентрациях и их концентрации в кровотоке значительно ниже необходимых для осуществления ферментативных превращений с заметной скоростью (константа Михаэлиса!), имеют все шансы пройти печень без биотрансформации и достигнуть в неизменном виде жировых тканей для депонирования. Поэтому первостепенной задачей для химической безопасности кормления животных становится блокирование поступления липофильных токсинов из желудочно-кишечного тракта в кровоток даже при их невысоких концентрациях в кормах. Необходимо наряду с уже традиционными сорбентами применять и неполярные сорбенты типа холестирамина, активированного угля, сорбентов, содержащих гуминовые кислоты или гидрогелей обращенно-фазовых сорбентов на полисиликатной основе, а также их комбинаций. Эта необходимость для молочных ферм не может подвергаться сомнениям. Существует также острая необходимость в разработке и внедрении новых эффективных и экономичных неполярных кормовых адсорбентов в практику молочного животноводства.

Как уже упоминалось, в данной работе продемонстрирована высокая эффективность данного сорбента (ПОПСГ) по снижению переноса липофильных хлорированных пестицидов альдрина (Log Pow = 4.5), диэльдрина (Log Pow = 3.7) и гептахлора (Log Pow = 4.3), которые представляют собой типичные СОЗ, в коровье молоко. В течение 2018 года испытания ПОПСГ проводились в нескольких молочных хозяйствах Московской и Калужской областей. В ходе испытаний также определяли содержание хлорированных пестицидов: изомеров гексахлорциклогексана, ДДТ и его метаболитов, ДДД и ДДЭ, а также альдрин, диэldrин и гептахлор в сыром молоке. В заметных количествах пестициды (ДДТ, ДДД, ДДЭ, альдрин, дильдрин и гептахлор) были обнаружены в молоке контрольной группы единственной фермы, расположенной на северо-востоке Калужской области. Концентрация ДДТ и его метаболитов оказалась в диапазоне между нижними пределами детектирования и количественного определения, поэтому они не были включены в таблицу 1. В опытных образцах молока из этого хозяйства после применения ПОПСГ в течение 30 дней ДДТ и его метаболиты, альдрин, диэldrин и гептахлор обнаружены не были. Можно предположить на этом основании, что его эффективность в связывании наиболее токсичных тетра- и пентахлорбифенилов, дибензодиоксинов и дибензофуранов или полибромированных дифениловых эфиров будет не ниже, чем у ДДТ и его метаболитов, поскольку коэффициенты распределения этих веществ находятся в том же диапазоне и варьируют от 6,0 до 7,0 (см. Табл. С3).

Можно также с высокой долей вероятности предсказать, что ПОПСГ будет способен эффективно выводить из организма позвоночных также и основную причину развития «райграссового пошатывания» (ryegrass staggers) липофильного микотоксина лолитрема В (Log Pow = 5,8). Подтверждение этому может быть получено после изучения вопроса на практике. Можно высказать предположение, что применение ПОПСГ или сходных по

свойствам новых неполярных адсорбентов позволит не только снизить перенос СОЗ в молоко, но также снизить загрязнение других продуктов животноводства (мясо, яйца, икра) СОЗ и другими липофильными токсинами и вывести красное мясо из чёрного списка ВОЗ.

Применение неполярных адсорбентов предположительно может оказать положительное влияние на решение проблем, связанных с такими отрицательными явлениями в молочном животноводстве, как, «летний спад» (summer slump), «летний мастит» (summer mastitis), «овяничный токсикоз» (fescue toxicosis) или «райграссовое шатание» (ryegrass steggars). Микотоксины эндофитных грибов, которые наиболее активно развиваются в теплое время года, совместно с ПАУ и СОЗ могут играть не последнюю роль в их возникновении и развитии наряду с тепловым стрессом. Согласно данным, приведенным в таблице С1, о чём было сказано выше, очевидно, что среди метаболитов эндофитных грибов, по сравнению с «полевыми» или «складскими» грибами содержание неполярных микотоксинов, пока предположительно, значительно выше. Кроме того, в период летнего выпаса молочный скот подвергается дополнительной токсической нагрузке со стороны ПАУ и СОЗ, которые на 100% относятся к неполярным соединениям. В теплое время года с ростом температуры значительно увеличивается возгонка в атмосферу и перенос пылевых частиц, содержащих ПАУ и СОЗ, на значительные расстояния и их отложение на поверхность травы и почвы [44, 47]. Во время выпаса коровы вместе с травой заглатывают и некоторое количество частиц почвы (до 1 кг в день), а содержание ПАУ и СОЗ в почве может во много раз превышать их содержание на поверхности трав [47]. Вероятно, по этой причине все перечисленные «летние бедствия» в наибольшей степени проявляются именно в конце летнего сезона, как результат постепенной биоаккумуляции неполярных токсинов в течение тёплого сезона, когда эндофитные грибы наиболее активны и продуктивны, а перенос на пастбища, возгонка в атмосферу ПАУ и СОЗ, и их отложение на траве и почве и поедание скотом с частицами почвы значительно увеличивается. Нельзя исключать из рассмотрения и ингаляционный способ аккумуляции ПАУ и СОЗ на пастбище, когда животные во время кормёжки дышат воздухом из приземных слоёв, в котором могут содержаться высокие концентрации возгоняющихся ПАУ и СОЗ.

Это подтверждается литературными данными. Так, авторы одной из статей по изучению влияния сезонности на уровень надоя молока и КСК отметили, что самый низкий уровень КСК и самая высокая удоиность в большинстве молочных ферм во Флориде наблюдаются с февраля по апрель. Они также призвали к разработке новых программ по улучшению качества молока, которые должны быть ориентированы на условия содержания животных в период с августа по октябрь, потому что в это время большинство ферм демонстрируют заметное увеличение КСК в сборном молоке и снижение удоев [99].

3.5. О выборе «правильных» кормовых адсорбентов в молочном животноводстве

Поскольку в практическом молочном животноводстве стандартизация корма по уровню содержания токсических примесей принципиально невозможна, то целесообразно использовать тест-панели из разных сорбентов, как полярных, так и неполярных для определения наиболее подходящих из них или их комбинаций и необходимых дозировок для каждой конкретной партии корма. Следует учитывать, что дозировка адсорбента обратно пропорционально связана с качеством применяемого корма, концентрации токсических примесей и срока применения токсичных кормов (биоаккумуляция). КРС представляет для этого удобную модель, так как они даже при качественном уходе весьма мобильно отзываются на качество кормов и наглядно демонстрируют это с помощью такого важного показателя качества молока, как КСК.

Известно, что КСК существенно возрастает при применении токсичных кормов [65,90,91, 95-97]. Вероятнее всего, это связано с отрицательным влиянием токсических компонентов кормов на иммунную систему животных, функция которой может подавляться как представителями МКТ [66,82-84,100-102], так и ПАУ, и СОЗ [103-106]. Также известно, что многие МКТ в условиях *in vitro* проявляют цитотоксические и цитостатические свойства. В недавнем обзоре на эту тему сопоставлялись данные о биологической активности разных МКТ в отношении модельных опухолевых клеток млекопитающих, включая человека [107]. Приведенная в данном обзоре информация позволяет заключить, что десятки микотоксинов проявляют *in vitro* противоопухолевую активность в микромолярном диапазоне концентраций, некоторые, например, аустоцистин D, брэфельдин A, глиотоксин, лейцинонстатин A, офибоблин A и вортманнин активны уже в наномольном диапазоне, а отдельные, например, метаболит эндофитных грибов рода *Chaetomium*, 11-эпихетомутилин I проявляет цитотоксическую активность против модельных опухолевых клеток уже в пикомольном диапазоне. В связи с этим можно предположить, что такая же цитотоксическая активность микотоксинов *in vivo* может быть направлена против быстро делящихся клеток тонкого кишечника, а также клеточных элементов иммунной системы животных, что может приводить к расстройствам пищеварения и приобретённому иммунному дефициту и, как следствие, к развитию воспалительных заболеваний кишечника и других органов.

В рамках такой модели «идеальный» адсорбент, который может быть подобран только эмпирическим путём, должен быть способным к связыванию достаточных количеств токсинов, особенно неполярных, в желудочно-кишечном тракте. Поэтому очень важна высокая ёмкость адсорбента и прочность связывания сорбата в водной среде. Эффективным с практической точки зрения можно считать адсорбент (или комбинацию из 2-3 адсорбентов, один из которых обязательно должен быть неполярным), который при использовании наличных кормов и применяемых дозировок способен поддерживать КСК на уровне 80,000 – 120,000 клет/мл в течение длительного времени, и применение которого экономически оправдано.

Известно, что при снижении КСК в сборном молоке обычно наблюдают увеличение удоя [1,2,11,95,97], что может служить бонусом для оправдания материальных затрат на приобретение адсорбентов. Дополнительный бонус в таком случае обеспечивается ещё и более высокой ценой за молоко с более низким КСК. Кроме того, с помощью «правильных» адсорбентов против неполярных токсинов можно ожидать увеличения количества лактаций у коров и получения от них более качественного потомства и более безопасной товарной продукции — мяса и молока.

Поскольку выбор «правильного» адсорбента и, тем более, эффективной комбинации нескольких адсорбентов в стаде лактирующих коров представляет собой длительный, трудозатратный и достаточно дорогой процесс, представляется целесообразным проведение предварительной проверки влияния адсорбентов выбора на токсичность кормов на более простых биологических системах. К таким системам можно отнести тесты на токсичность на личинках рассольных рачков, *Artemia salina* [108,109] на простейших, *Styloynchia mytilus* [110] или на клеточных линиях млекопитающих [107].

Для подбора «правильных» адсорбентов нас в первую очередь интересует соотношение полярных и неполярных токсинов в образцах корма. Поэтому наиболее подходящей системой для экстракции токсинов перед определением токсичности корма представляется та же система, которая используется для определения степени полярности органических веществ — система октанол:вода [74]. После проведения экстракции и центрифугирования эта система расслаивается, что способствует независимому определению токсичности полярных и неполярных токсинов в водной и октанольной фазах соответственно.

Параллельное определение токсичности этих фаз без применения адсорбентов и в присутствии адсорбентов разной полярности в концентрациях 0,1 — 0,5 % позволит с минимальными затратами проводить оценку эффективности разных адсорбентов или их комбинаций.

5. Заключение

На сформированной в данной работе базе данных по некоторым физико-химическим свойствам микотоксинов ($n = 1500$) проведена оценка соотношения полярных, умеренно полярных и неполярных (липофильных, или гидрофобных) микотоксинов. Показано, что доля липофильных микотоксинов превосходит долю полярных (14%) и умеренно полярных (40%) микотоксинов и составляет более 46%. Сходные результаты были получены при анализе данных литературы по контаминированию липофильными микотоксинами реальных кормов для молочного скота [20,26]. Известно, что в кормах для молочного скота всегда присутствуют ещё две группы липофильных токсинов — ПАУ и СОЗ [45,47]. Можно сделать вывод, что на фоне присутствия в кормах для молочного скота большего разнообразия неполярных токсинов по сравнению с кормами для птицеводства и свиноводства, в молочных хозяйствах необходимо обязательно использовать и неполярные кормовые адсорбенты. Эта необходимость подтверждается результатами данной работы. Показано, что новый гидрофобизированный адсорбент на основе ПОПСГ превосходит обычные «традиционные» адсорбенты, в том числе и активированный уголь, по способности связывать липофильные токсины *in vitro*. Ранее нами было показано, что *in vivo* ПОПСГ эффективно защищает лактирующих коров от неполярных токсинов из кормов. Это выражалось в быстром снижении КСК (-64%) и в увеличении удоев (+11%) [95]. В данной работе установлено, что в стаде лактирующих коров *in vivo* ПОПСГ позволяет за короткое время существенно снизить перенос хлорированных пестицидов альдрина, диэльдрина и гептахлора в молоко, скорее всего, за счёт их выведения из желудочно-кишечного тракта животных. На этом основании можно с высокой долей вероятности полагать, что применение ПОПСГ может быть полезно для купирования симптоматики «райграсового шатания» и других отрицательных явлений, связанных с эндофитными микотоксинами и «летним спадом». В связи с этим необходимо уделить особое внимание к разработке и внедрению в практику молочного животноводства новых эффективных неполярных адсорбентов.

Полученные результаты позволяют прогнозировать, что после всестороннего изучения их свойств и более широкого их применения для защиты поголовья от неполярных токсинов из кормов можно будет добиться увеличения сроков продуктивной жизни молочных коров, повышения качества ремонтных тёлочек, а также увеличения продуктивности животных и повышения качества и безопасности животноводческой продукции для потребителей.

Всё вышеописанное может оказаться полезным в молочных хозяйствах, которые в силу разных причин не всегда способны поддерживать достаточно высокое качество кормовой базы. Необходимо признать, однако, что эти рассуждения имеют практический смысл, и максимальная выгода от применения адсорбентов может быть получена лишь в тех случаях, когда соблюдаются все нормативные условия содержания и ухода за животными и только качество корма имеет критическое значение.

6. Материалы и методы

6.1. Материалы

Забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS, номер по каталогу P3813) и нафталин (аналитический стандарт, номер по каталогу 84679-250 мг) были приобретены у Merck (Sigma-Aldrich, США), зеараленон (номер по каталогу 3975/10) - от Tocris Biosciences, Великобритания и использовались без дальнейшей очистки. Для приготовления подвижной фазы для ВЭЖХ использовали ацетонитрил 2 сорта (Криохром, ООО, Российская Федерация) и дистиллированную воду. Алюмосиликатный адсорбент и адсорбент из клеточных стенок дрожжей были приобретены у местных дилеров импортных производителей. Активированный уголь был куплен в ближайшей аптеке. Кормовая добавка «Алвисорб»® (ПОПСГ) была получена со склада готовой продукции ООО НПЦ «Фокс и Ко» (г. Москва, Российская Федерация).

6.2. Связывание с адсорбентами

Связывание сорбатов с адсорбентами осуществляли в растворе PBS с pH = 7,4, приготовленном в дистиллированной воде, при комнатной температуре в стеклянных пробирках. Нафталин и зеараленон растворяли в ацетонитриле в концентрации 1,0 мг/мл. Адсорбенты (кроме ПОПСГ) сушили до постоянного веса при 105°C и суспендировали в PBS в концентрации 3,5 мг/мл с помощью магнитной мешалки. При постоянном перемешивании из суспензий каждого адсорбента отбирали аликвоты и 6 г суспензии помещали в три стеклянные пробирки с притёртыми пробками. В контрольные пробирки помещали 6 г PBS и 0,1 мл раствора сорбата добавляли в каждую пробирку. Пробирки были закрыты, пробки были зафиксированы с использованием полоски Parafilm, и пробирки помещали в ротационный смеситель Multi Bio RS-24 (Bio San Ltd., Латвия). Образцы инкубировали в течение 3 часов при комнатной температуре и скорости вращения 30 об/мин. Образцы центрифугировали в течение 15 минут при 2000 об/мин, и концентрации сорбатов в супернатанте из всех пробирок анализировали с помощью ОФ-ВЭЖХ.

6.3. Хроматографический анализ

Образцы анализировали в хроматографической системе, состоящей из насоса высокого давления K-501, термостата JetStream Plus с ручным инжектором A1365 с петлей 20 мкл, УФ-детектора K-2501 (Knauer GmbH, Германия) и системы обработки данных «Multichrom» (Амперсанд, ООО, Российская Федерация). Колонка - Phenomenex Luna C8 (2), 3 мкм, 4,6 × 100 мм (№ 00D-4248-E0, Phenomenex Inc., США). Анализ проводили при скорости потока 0,75 мл/мин и температуре термостата колонки 35°C в изократической системе ацетонитрил: вода = 60:40 (об/об). Детекцию нафталина проводили при 221 нм, а зеараленона - при 236 нм.

Количественное определение проводилось по методу внешнего стандарта. Каждую пробирку анализировали три раза и рассчитывали среднее значение остаточной концентрации сорбата. Концентрация сорбатов в контрольных пробирках принималась за начальную концентрацию. Сорбционную емкость адсорбентов для каждого из сорбатов рассчитывали по разнице между исходной и остаточной концентрациями. Чтобы определить сорбционную способность ПОПСГ, три его точных навески были высушены при 105°C до постоянного веса, и емкость адсорбентов была рассчитана на единицу их сухого веса.

6.4. Определение пестицидов в сыром сборном молоке.

Коровы из экспериментальной группы (n = 65) получали кормовую добавку ПОПСГ вместе с кормом во время утреннего кормления в дозе 2 г на 1 кг корма в течение 40 дней. Коровы контрольной группы (n = 65) получали тот же корм без добавки. Условия содержания, кормления и доения коров были описаны ранее [95]. На сороковой день эксперимента образцы сырого молока отбирали в каждой

группе после утреннего доения, замораживали и хранили при температуре не выше -18°C до анализа. Пестициды анализировали методом ГЖХ-МС с использованием стандартной методики. Пределы обнаружения и количественного определения в используемом методе составляли 2 и 3 мкг/кг соответственно.

6.5. Таблицы коэффициентов распределения для микотоксинов, полиароматических углеводов и стойких органических загрязнителей.

В части исследования, посвященном оценке степени полярности микотоксинов, ПАУ и СОЗ, представлены расчетные значения коэффициентов распределения в системе октанол/вода (Log Pow): XLOGP3-AA (модель чистого атомно-аддитивного типа XLOGP3) [62], выбранные из базы данных PubChem [63] для различных химических соединений.

База данных по микотоксинам первоначально была основана на техническом методе определения 243 микотоксинов с использованием жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием [111], в котором приводились значения рассчитанных коэффициентов распределения микотоксинов и некоторых других метаболитов в системе октанол/вода. Дополнительные данные о микотоксинах были получены путем анализа научных обзоров и статей по изучению их свойств [22,23,26,69,70,112-117] и других источников из литературы или Интернета.

Литература (см. в оригинальной статье по ссылке:

<https://www.mdpi.com/2072-6651/11/5/256>)