

---

# ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

---

Вал.А. Коварский\*, Б.С. Филипп\*\*

## ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ КОРМОВ ДЛЯ БРОЙЛЕРОВ, СОДЕРЖАЩИХ МИКОТОКСИН ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛ (ВОМИТОКСИН)

*\*Институт физиологии и санокреатологии АН Молдовы,  
ул. Академией, 1, г. Кишинев, MD-2928, Республика Молдова*

*\*\*Институт прикладной физики АН Республики Молдова,  
ул. Академией, 5, г. Кишинев, MD-2028, Республика Молдова*

Микроскопические грибы, развивающиеся на кормах, способны вырабатывать токсины, вызывающие отравление сельскохозяйственной птицы, особенно молодняка. Например, в условиях Молдовы, в связи с хранением влажного зерна пшеницы, часть его оказалась загрязненной микотоксином дезоксиниваленолом (ДОН) (вомитоксин) и непригодной для кормления. Присутствие ДОН в пищевой пшеничной муке является также реальной опасностью для здоровья человека. Разработка технологий обезвреживания кормов, содержащих ДОН, является актуальной задачей санитарии и гигиены [1].

Известен метод обработки растительного сырья на корм, включающей его измельчение и электромагнитное облучение, обеспечивающее обеззараживание микотоксинов при температуре 175–200 °С [2]. Недостатком известного способа является большая энергоемкость обработки загрязненного микотоксином корма.

Цель исследований – разработка оптимальной технологии обезвреживания загрязненных ДОН кормов для бройлеров, включающих его измельчение и электромагнитное облучение при комнатной температуре в открытой воздушной среде, совершенствование фотодинамической модели процесса обезвреживания микотоксинов.

Поставленная цель достигается тем, что взамен разрушительного воздействия высокой температуры на микотоксины, загрязняющие корм, используется активный кислород, который в момент его возникновения при оптической обработке корма разрушает микотоксины, находящиеся в возбужденном состоянии. Активный кислород образуется в достаточном количестве вследствие фотодинамической технологии обработки кормов [3, 4]. Идея метода обезвреживания связана с существованием долгоживущего триплетного возбужденного состояния молекулы ДОН, которое может быть обнаружено после оптической обработки муки методами спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [4]. В этом состоянии молекула кислорода (основное состояние триплет) взаимодействует с возбужденным триплетным уровнем ДОН; происходит образование активного кислорода (синглетный кислород), способного инактивировать токсические свойства молекулы ДОН.

### **Методика опытов**

#### **1. Фотодинамическое действие оптического излучения на молекулы ДОН**

Для обнаружения возбужденного триплетного состояния молекулы ДОН использовался метод фотоиндуцированных (ФИ) сигналов ЭПР, измеряемых радиоспектрометром. Осуществлялось сканирование по частоте длин волн света видимого диапазона в районе частоты спектра возбуждения фосфоресценции ДОН ( $\lambda = 425$  нм) и выявлялись ФИ сигналы ЭПР в загрязненной муке.

Для изучения этого явления использовались сухие семена пшеницы *Triticum aestivum*, загрязненные микроскопическими грибами *Fusarium* и микотоксином ДОН в концентрации 3,2 мг/кг корма. Это значительно превышает известные предельно допустимые концентрации микотоксина для сохранения здоровья животных, равные 1 мг/кг корма. После размола равные навески муки контрольного и опытного образцов помещались под облучатель ЛОС-2. Источником излучения служила ксеноновая лампа мощностью 1 кВт. Тонкий слой муки облучали в течении 30 мин. Температура на поверхности образцов не превышала 30°C. Использовался стандартный набор интерференционных фильтров. Мука подвергалась облучению соответственно при длинах волн  $\lambda = 313, 334, 365, 405, 536$  нм. Снятие спектров ЭПР проводили на серийном радиоспектрометре S<sup>e/x</sup> –2544. Внутренним стандартом служили кристаллы Mn<sup>2+</sup>MgO, закрепленные в резонаторе.

## **2. Выявление антитоксического фотодинамического эффекта обработки муки загрязненных ДОН по реакции гемолиза**

ДОН относится ко второй группе сильнодействующих ядовитых веществ. Токсическая доза ЛД<sub>50</sub> ДОН для двухдневных цыплят бройлеров составляет 162,5 мг/кг корма. Окончательное суждение о токсичности корма производят по биопробе [5]. Для выявления токсичности кормов эффективна реакция гемолиза [6] с использованием критерия выживаемости куриных эмбрионов [7].

Для выявления фотодинамического влияния обработки на скорость гемолиза использовалась вышеописанная мука, загрязненная ДОН. Выбор образцов корма, технологии обработки, мощность ламп, частоты электромагнитного излучения, времени обработки и температуры аналогичны параметрам, описанным выше.

Микотоксин ДОН экстрагировали из корма смесью ацетонитрила и воды (84:16) в течение 24 часов в закрытом сосуде при комнатной температуре. Экстракт выпаривали на роторном испарителе; полученное жировое пятно растворяли в буферной среде с глицерином и использовали для анализа. Токсичность экстрактов оценивали по реакции гемолиза в основном по методике [8].

## **3. Выявление антитоксического фотодинамического влияния обработки муки, загрязненной ДОН, на выживаемость куриных эмбрионов**

Оценку токсичности экстрактов из оптически обработанных образцов муки выполняли на семидневных куриных эмбрионах [7]. Электромагнитное облучение контрольных и загрязненных ДОН образцов пшеничной муки выполняли с использованием ксеноновой лампы мощностью 1 кВт, под фильтрами в диапазоне частот  $\lambda = 330-700$  нм в течение 20 мин при комнатной температуре и открытой воздушной среде. Интенсивность воздействия на поверхности образцов составила 0,1 – 0,15 Вт·см<sup>-2</sup>. Навески из необлученной и облученной муки, содержащие ДОН, использовали для экстракции аналогично образцам, описанным выше. Жировое пятно, содержащее микотоксин ДОН, растворяли в пропиленгликоле из расчета 1 мкг ДОН в 0,1 мл растворителя. Пропиленгликоль выбран как нейтральный растворитель, который не влияет отрицательно на развитие куриных эмбрионов. Экстракты из контрольных и опытных образцов вводили в желток эмбриона шприцем. В течение 14 дней инкубации учитывали количество погибших эмбрионов. В конце инкубации на 21-й день жизни учитывали количество вылупившихся цыплят и их качество оценивали по состоянию здоровья.

### **Результаты**

1. При сканировании по частоте оптического возбуждения в районе  $\lambda_{\text{макс}}$  флуоресценции выявлены ФИ сигналы ЭПР, свойственные молекуле ДОН в составе образцов муки. Они представляют собой слегка асимметричные сигналы с полушириной  $\sim \Pi$  гаусс и q-фактором, равным 2,002. Установлено, что спектр возбуждения ФИ сигналов ЭПР, загрязненных ДОН кормов, имел максимум при  $\lambda = 405 \pm 10$  нм (142,5%), то есть смещен в «синюю» сторону от  $\lambda_{\text{макс}}$  флуоресценции, равной 425 нм.

Интенсивность ФИ сигнала ЭПР контрольного образца не превышала величины собственного (темнового) сигнала.

2. В результате исследования реакции гемолиза на влияние экстрактов из оптически обработанной муки, загрязненной ДОН, установлено, что по интенсивности гемолиза она существенно различается в зависимости от длины волны света (см. таблицу), использованной для оптической обработки испытуемого образца муки.

Отмечено, что оптическая обработка муки, загрязненной ДОН в диапазоне частот  $\lambda = 313$  нм, резко увеличивает (566%) интенсивность гемолиза. В то же время в полосе оптической обработки муки при длинах волн 334, 365, 405, 531 нм отмечена «задержка» гемолиза, то есть отсутствие токсического действия ДОН на эритроциты. Полученный результат указывает на возможность обезвреживания ДОН при оптической обработке кормов. Известно, что ДОН имеет максимум поглощения в

УФ–области. В связи с общим действием УФ–облучения на белки, жиры, нуклеиновые кислоты и образованием свободных радикалов (СР) возможно, что ускорение гемолиза под влиянием экстрактов корма, загрязненных ДОН в оптическом диапазоне с  $\lambda = 313$  нм, вызвано отрицательным влиянием СР на мембрану эритроцитов.

*Спектр фотобиологического действия экстрактов оптически обработанных образцов муки пшеницы, загрязненных микотоксином ДОН на реакцию гемолиза*

Длина волны (нм) для оптической обработки образца	Коэффициент оптической плотности супернатанта (Д*)	Д (в % к контролю реактивов)
313	5,291	566
334	0,968	104
365	0,909	97
405	0,920	98
536	0,942	101
Контроль реактивов	0,9345	100
Нативный образец (без обработки светом)	1,057	113

\* – среднее из четырех вариантов.

3. Установлено, что между токсичностью обработанных и необработанных оптическим излучением кормов, загрязненных ДОН, и смертностью эмбрионов при введении в желток эмбриона экстрактов микотоксина, имеется связь. Так, если в группе эмбрионов, которым введено по 2 мкг нативного ДОН, погибло 60%, то введение этой же дозы токсина, предварительно оптически обработанной, было безвредно: выживаемость цыплят относительно контроля – 100% (в качестве контроля использовалась группа, где в эмбрион введен только растворитель). Таким образом, оптическая обработка муки из зерна пшеницы, загрязненных микроскопическими грибами *Fusarium* и продуктами их метаболизма митотоксинами ДОН, обезвредила токсическое действие ДОН на выживаемость эмбрионов и выход вылупившихся цыплят.

#### **Фотодинамическая модель процесса обезвреживания ДОН в кормах, загрязненных микроскопическими грибами *Fusarium***

Молекулярная модель процесса, схема уровней энергии реализуется в схеме Яблонского для ДОН [4]. В соответствии с этой схемой процесс оценивается следующим образом. Фотовозбуждение триплетного уровня молекулы ДОН проводится при оптическом возбуждении синглетного перехода  $S - S^*$  с дальнейшим безызлучательным переходом  $S - T^*$  (здесь  $S$  – основное синглетное состояние;  $S^*$  – возбужденное синглетное состояние;  $T^*$  – возбужденное триплетное состояние). При взаимодействии триплетного кислорода молекулы  $O_2$  с триплетным уровнем ДОН происходит образование активного кислорода и возникновение радикальных форм, способных разрушить молекулу ДОН. Размыкание эпоксидного кольца молекулы ДОН при  $S_{12,13}$  приводит к полной потере цитотоксических свойств [1]. Наблюдаемое обезвреживание возникает после разрыва в треугольном кольце эпоксидной группы ДОН [1, 4, 8]. Такой разрыв приводит к локализации возбуждения молекулы ДОН на триплетном уровне. Возникающие после фотообработки дериваты молекулы ДОН безвредны для здоровья животных.

#### **Метод обезвреживания кормов, загрязненных микотоксинами ДОН**

Метод включает измельчение кормов и электромагнитное облучение в диапазоне длин волн, соответствующих спектру возбуждения долгоживущих ФИ сигналов ЭПР для микотоксина ДОН ( $\lambda = 405 \pm 10$  нм), при интенсивности облучения  $0,10 - 0,15$  Вт·см<sup>-2</sup> в течение 20 – 30 мин в воздушной среде при комнатной температуре. Принципиальная схема устройства для облучения кормов с целью фотодинамического воздействия на корма ранее описана и реализуется в виде установок ФОК-2, ФОК-2А, ФОК-3 [3].

В установках ФОК-3 используются лампы ДРЛ-400, спектр излучения таких ламп с фосфат-ванадиевым люминофором обеспечивает световой поток ~23 клм, мощностью 0,4 кВт с диапазоном длин волн 310 – 700 нм и максимумом  $\lambda = 405$  нм, необходимых для возбуждения триплетного состояния молекул ДОН. Поэтому установки типа ФОК-3 пригодны для обезвреживания кормов, загрязненных ДОН. В этих целях для использования таких установок необходима их нормировка. Задачей

нормировки является выявление режима работы установки, обеспечивающей оптимальную величину энергии (кВт·ч/кг корма), необходимой для обезвреживания корма. В установках ФОК-3 используются 20 ламп ДРЛ-400 суммарной мощностью 8 кВт.

При скорости обработки 100 кг муки в час поглощенная энергия составляет 0,08 кВт·час/кг корма, при скорости обработки 50 кг – соответственно 0,160 кВт·час/кг, при 25 кг – 0,32 кВт·час/кг (скорость обработки корма регулируется дозатором установки).

Для обезвреживания ДОН в кормах, загрязненных микотоксинами в количестве 3,2 мг/кг корма, эффективной является скорость обработки на установках ФОК-3 50 кг муки в час.

Выбор оптимальной скорости обработки корма в установках ФОК-3, обеспечивающей биологический эффект обезвреживания ДОН, проводится различными методами, например, по реакции задержки гемолиза [6], увеличению выживаемости куриных эмбрионов при введении экстрактов из оптически обработанного загрязненного микотоксином корма в желток яйца и последующей инкубации яиц по стандартной методике [7], а также возможно использование метода клинического наблюдения за состоянием здоровья при скармливании обезвреженного корма лабораторным животным. В качестве экспресс-метода выявления эффекта оптического обезвреживания муки, загрязненной ДОН, целесообразно использование метода тушения ФИ сигналов ЭПР после оптической обработки корма на частотах  $\lambda = 405 \pm 10$  нм [4].

### **Технология фотообработки кормов растительного происхождения, загрязненных микотоксином ДОН для бройлеров**

Дефектное зерно размалывают; в муке определяют концентрацию ДОН стандартным методом [9]; муку подвергают электромагнитному воздействию по вышеописанному методу, при перемешивании, комнатной температуре и открытой воздушной среде. Обезвреженный корм смешивают с нетоксичными ингредиентами до уровня предельно допустимых санитарных норм ДОН и скармливают бройлерам.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Тутельян В.А., Кравченко Л.В. Микотоксины (медицинские и биологические аспекты). М., 1985.
2. Новиков А.Н., Рыбштына В.М., Ковалев И.И. и др. Рекомендации по применению в сельскохозяйственном производстве и комбикормовой промышленности технологий и средств для обезвреживания кормов УФ-излучений в комбинации с химическими средствами. ВАСХНИЛ, ЦНПТИМЭЖ. Рекомендованы и одобрены НТС Запорожской области управления сельского хозяйства. Протокол №15 от 06.12.1985. Запорожье, 1986.
3. Коварский Вал.А., Филипп Б.С. Фотодинамическая технология повышения обменной энергии кормов растительного происхождения // Электронная обработка материалов. 2003. № 1. С. 67 – 72.
4. Коварский Вал.А., Коварский В.А., Филипп Б.С. Метод фотоиндуцированных сигналов электронного парамагнитного резонанса для диагностики микотоксинов // Электронная обработка материалов. 1994. № 5. С. 65 – 67.
5. Таланов Г.А., Хмелевский Б.Н. Санитария кормов / Справочник. М., 1991.
6. Коварский Вал.А., Филипп Б.С., Саевская Л.С. и др. Метод определения токсичности кормов, загрязненных микроскопическими грибами // Изв. АН РМ. Биол. и хим. науки. 1994. № 5. С. 57 – 61.
7. Ветеринарные препараты / Справочник / Под ред. А.Д.Третьякова. М., 1988.
8. Коварский Вал.А., Филипп Б.С., Саевская Л.С. Метод оптической обработки кормов для бройлеров, содержащих микотоксин дезоксиниваленол (вомитоксин) // Изв. АН РМ. Биол. и хим. науки. 1997. № 3. С. 74 – 77.
9. Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания дезоксиниваленола (вомитоксина) в зерне и зернопродуктах. Утвержден зам. Госуд. санитарного врача СССР. 10.10.85 г., № 3940-85.

*Поступила 19.06.2003*

### **Summary**

The render of micotoxine deoxynivalenol (vomitoxine) in fodders for broilers by the action on meal flour the visible light at room temperature and exposed on air prevents hemolyzis and downfall 7-days hen embryos after injection the food's extracts into jolks. The photodynamic model of process is discussed.