

О. В. Труфанов

ПРОФІЛАКТИЧНА ДІЯ *BACILLUS SUBTILIS* ПРИ Т-2 ТА НТ-2 ТОКСИКОЗАХ КУРЧАТ

Інститут птахівництва Української академії аграрних наук, м. Харків

Т-2 і НТ-2 токсикози птахів виникають унаслідок хронічного впливу трихотеценових мікотоксинів, присутніх у недоброякісних кормах. За даними аналізів, проведених у лабораторії мікотоксикології Інституту птахівництва УААН, близько 20% зерна і комбікормів забруднені Т-2 і НТ-2 токсинами [1, 2]. До ознак Т-2 токсикозу відносяться некротичний стоматит, зниження приросту живої маси, збільшення падежу, погіршення м'ясної і яєчної продуктивності [3], пригнічення біосинтезу білка [4] та імуносупресія [5]. Про дію НТ-2 токсину на птицю раніше не повідомлялось.

Найбільш ефективним засобом профілактики мікотоксикозів є запобігання забруднення зерна мікотоксинами на всіх етапах його виробництва та під час зберігання [6]. У випадку забруднення зерна мікотоксинами необхідно застосовувати препарати, що знижують інтенсивність шкідливого впливу мікотоксинів. До таких препаратів відносять пробіотичні мікроорганізми [7] та сорбенти [8].

Профілактична дія пробіотичних мікроорганізмів при мікотоксикозах базується на їх здатності трансформувати або метаболізувати мікотоксини [9]. На даний час виявлені мікроорганізми, які синтезують карбоксилестерази та епоксидгідролази [10], що трансформують трихотеценові мікотоксини, лактонгідролазу (руйнує зеараленон) [11], фуномінінгідролазу [12], УДФ-глікозилтрансферази, що знижують токсичність дезоксинівалену [13] та інші. Крім того, пробіотичні мікроорганізми продукують цілий ряд біологічно активних речовин, що підвищують стійкість пташиного організму до негативної дії мікотоксинів. До таких речовин відносяться

органічні кислоти, антибіотики, гідролітичні ферменти, поверхнево-активні речовини, вітаміни та незамінні амінокислоти. Одним з найбільш привабливих мікроорганізмів для створення пробіотичних препаратів є *Bacillus subtilis*. Бактеріям цього виду властива здатність продукувати усі перераховані вище біологічно активні речовини [14-16]. На основі бактерій штамів *B. subtilis* 090 та *B. subtilis* 8130 створено препарати "Моноспорин ПК" та "Бацелл", які з успіхом застосовують для лікування та профілактики інфекційних захворювань сільськогосподарського тварин, підвищення приростів живої маси та поживної цінності кормів [17].

Метою даної роботи було вивчення лікувально-профілактичного ефекту випоювання курчат препаратом *B. subtilis* 090 і включення в корм препарату *B. subtilis* 8130 на протікання хронічних Т-2 — та НТ-2 токсикозів.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на курчатах породи полтавська глиняста, яких утримували в клітках у стандартних умовах по 10 голів у секції. Було сформовано 7 груп по 10 голів у групі. Перша група — контрольна. У корм 2-4 груп вносили Т-2 токсин, 5-7 — НТ-2 токсин у концентраціях 10 і 16 мг/кг, відповідно. Курчат 3, 4, 6 і 7 груп вypoювали препаратом бактерій штаму *B. subtilis* 090 ("Моноспорин ПК") з рівнем дози 3 мл на 100 голів на добу. У корм 4 і 7 груп включали препарат бактерій штаму *B. subtilis* 8130 ("Бацелл") у кількості 2 г на кг корму. Курчат годували кормовим концентратом для молодняку птиці у віці 5-30 днів "КК 2-6" відповідно до рекомендованих норм; воду давали *ad libitum* після вypoювання препаратом бактерій

штаму *B. subtilis* 090. Дослід проводили протягом 31 днів, починаючи з добового віку. Курчат зважували у віці 1, 8, 16, 24 і 31 день. Протягом дослідного періоду реєстрували прояв ознак некротичного стоматиту. Наприкінці досліду курчат присипляли діетиловим ефіром, декапітували та проводили забір крові. У плазмі крові визначали концентрацію сечової кислоти по реакції з фосфорно-вольфрамовим реактивом, креатиніну методом Яффе-Поппера і загального білка по біуретовій реакції з використанням наборів реактивів "Реагент" відповідно до інструкцій. Тушки розтинали, реєстрували патолого-анатомічні зміни, фотографували й утилізували в чеській ямі. Внутрішні органи зважували і розраховували їх відносну масу.

Т-2 токсин одержували методом адсорбційної колонкової хроматографії за раніше описаним методом з екстракту культури на зерні штаму *Fusarium sporotrichioides* 2m-15-206 [18]. НТ-2 токсин одержували шляхом лужного гідролізу Т-2 токсину. З реакційної суміші НТ-2 токсин екстрагували хлороформом і очищали методом розподільної колонкової хроматографії. Препарати *B. subtilis* "Моноспорин ПК" і "Бацелл" були люб'язно надані А. К. Карганяном (ТОВ СХП "Нива", м. Саки, АР Крим).

Статистичну обробку отриманих даних проводили методом множинних порівнянь Шеффе і шляхом знаходження критерію рангових сум Фрідмана [19]; групи 1-3 із групами 4-6 не порівнювали.

Результати та обговорення

Токсична дія мікотоксинів. У курчат, що одержували Т-2 токсин, спостерігалось зменшення живої маси (рис. 1), зниження середньодобового приросту живої маси на 31% (рис. 2), збільшення відносної маси серця на 16%, підшлункової залози на 27% і нирок на 52%, зменшення відносної маси селезінки на 62% і бурси на 31% (табл. 1), зниження концентрації загального білка на 39% і креатиніну в плазмі крові на 17% (табл. 2). Курчата, у корм яких був включений НТ-2 токсин, відставали в рості (середньодобовий приріст живої маси був нижче на 14%, рис. 2), відрізнялися відносно невеликою живою масою, підвищеною в 1,5 рази відносною масою нирок, низькою відносною масою се-

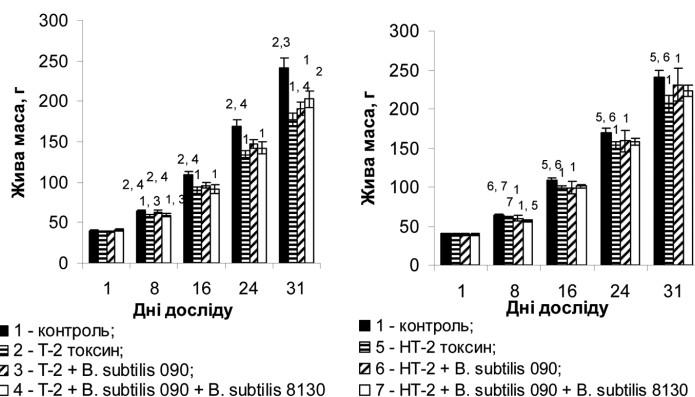


Рис.1. Динаміка зміни живої маси курчат

На цьому та рис. 2 цифри над стовпцями вказують номери груп, відмінності щодо яких статистично значимі ($p < 0,05$).

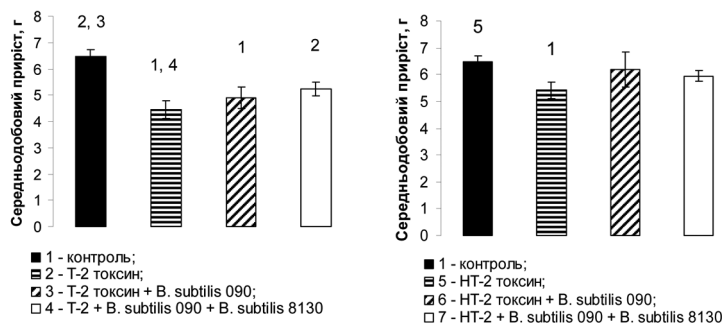


Рис. 2. Середньодобовий приріст маси курчат

лезінки (нижче на 30%) і підвищення вмісту сечової кислоти і креатиніну в плазмі крові (на 108% і 10%, відповідно).

Профілактична дія *B. subtilis* 090.

У результаті випоювання курчат препаратом "Моноспорин ПК" на тлі Т-2 токсикозу спостерігалася нормалізація живої маси на 16 і 24 день дослідю. Статистично значимих відмінностей від аналогічного показника контрольної групи не спостерігали. Відносна маса серця і нирок була, відповідно, на 9% і 21% нижча, ніж у групі, що одержувала тільки Т-2 токсин (табл. 1).

У курчат, яких випоювали "Моноспорином ПК" на тлі НТ-2 токсикозу, середній приріст живої маси не відрізнявся від контрольного показника. Відносна маса нирок у курчат, що одержували НТ-2 токсин і "Моноспорин ПК", була на 21% нижча, а концентрація загального білка в плазмі крові на 23% вища, ніж у курчат, що одержували тільки НТ-2 токсин (табл. 1 та 2).

Ефект одночасного застосування

B. subtilis 090 і *B. subtilis* 8130 при мікотоксикозах курчат. Застосування препаратів обох штамів *B. subtilis* на тлі Т-2 токсикозу курчат призвело до збільшення живої маси на 31 добу дослідю на 13% в порівнянні з групою, що одержувала тільки Т-2 токсин. Жива маса курчат, що одержували обидва препарати при НТ-2 токсикозі, на 16, 24 і 31 добу не відрізнялася від контролю. Середні прирости живої маси 4 та 7 груп за період з 24 по 31 добу експерименту не відрізнялися від середнього приросту живої маси у контрольній групі. Слід відзначити нормалізацію відносної маси серця і вмісту креатиніну в плазмі крові при комплексному застосуванні бактеріальних препаратів.

Як відомо, механізм токсичної дії трихотеценових мікотоксинів полягає в інгібуванні синтезу білка на всіх стадіях цього процесу [20, 21]. Одна молекула Т-2 токсину або НТ-2 токсину здатна повністю позбавити дієздатності одну рибосому [4]. Дані про вміст загального білка в

плазмі крові є підтвердженням цього. На рівні пташиного організму токсична дія Т-2 і НТ-2 токсинів виявляється також у зниженні швидкості росту, функціональної активності внутрішніх органів і пригніченні імунної системи.

Однією з причин підвищення концентрації креатиніну і сечової кислоти в крові може бути недостатня функціональна активність нирок, про що також свідчить компенсаторне збільшення їхньої відносної маси. Слід зазначити, що негативний ефект дії НТ-2 токсину на нирки був виражений у більшій мірі, ніж дії Т-2 токсину. Причина цього розходження, імовірно, криється в більш високій розчинності НТ-2 токсину у воді, внаслідок чого він не депонується в тканинах і органах з відносно високим вмістом ліпідів, у т. ч. у печінці, де протікають реакції біотрансформації ксенобіотиків. У незміненому вигляді НТ-2 токсин потрапляє в нирки, де проявляється його токсична дія, після чого елімінується з організму шляхом фільтрації.

Профілактична дія пробіотичних препаратів *B. subtilis* при Т-2 і НТ-2 токсикозах полягає в здатності бактерій цього виду продукувати при стресі ферменти сімейства α/β -гідролаз [22]. Ці ферменти характеризуються широким спектром каталітичної активності, тобто здатні метаболізувати найрізноманітніші сполуки. Стресовими факторами, що запускають механізм синтезу цих ферментів, можуть бути будь-які відхилення нормальних параметрів середовища мешкання *B. subtilis* [23]. Наприклад, у кишечнику курчат синтез α/β -гідролаз активується відносно високою температурою (42°C) і коливаннями кислотності. Ці фактори запускають синтез карбоксилестерази, що каталізує гідроліз складноестерних зв'язків Т-2 токсину, перетворюючи його в набагато менш токсичний метаболіт Т-2 тетраол і епоксидгідролази, що руйнує найбільш токсигенну епоксидну групу, у результаті чого утворюється практично нешкідливий деепоксид Т-2 тетраол. Ця сполука, по-перше, характеризується високою гідрофільністю, і, отже, не депонується в тканинах і швидко виводиться з організму, і, по-друге, не взаємодіє з рибосомами, тобто не пригнічує біосинтез білка [10]. Таким чином, карбоксилестерази і

Таблиця 1

Вплив препаратів бактерій *B. subtilis* 090 і *B. subtilis* 8130 на відносну масу внутрішніх органів (мг/100 г) курчат при Т-2 і НТ-2 токсикозах

Група	Серце	Печінка	Підшлункова залоза	Нирки	Селезінка	Бурса
Контроль	661±16 (2, 7)	2935±55 (3)	386±24 (2, 3)	930±38 (2, 4, 5, 7)	268±27 (2, 3, 4, 5)	554±51 (2, 3, 4, 7)
Т-2 токсин	768±53 (1, 3, 4)	3289±180	491±27 (1)	1412±111 (1, 3)	102±11 (1)	382±37 (1)
Т-2 токсин + <i>B. subtilis</i> 090 +	698±68 (2)	3728±191 (1, 4)	502±31 (1)	1119±125 (2)	122±18 (1)	361±47 (1)
Т-2 токсин + <i>B. subtilis</i> 090 + <i>B. subtilis</i> 8130	658±24 (2)	3012±84 (3)	458±27	1204±41 (1)	109±15 (1)	389±29 (1)
НТ-2 токсин	695±40 (7)	3340±230	434±26	1390±62 (1, 6)	188±35 (1)	482±32
НТ-2 токсин + <i>B. subtilis</i> 090 +	693±27 (7)	3177±95	431±27	1105±49 (5)	178±14	492±34 (7)
НТ-2 токсин + <i>B. subtilis</i> 090 + <i>B. subtilis</i> 813	604±13 (1, 5, 6)	3330±131	390±17	1212±42 (1)	188±15	363±20 (1, 6)

Примітка: в цій та табл.2 цифри в дужках вказують на номери груп, відмінності щодо яких статистично значимі ($p < 0,05$).

Таблиця 2

Вплив препаратів бактерій *B. subtilis* 090 і *B. subtilis* 8130 на діагностичні показники біохімічного складу крові курчат при Т-2 і НТ-2 токсикозах

Група	Гемоглобін, г/л	Загальний білок, г/л	Сечова кислота, ммоль/л	Креатинін, мкмоль/л
Контроль	141±12 (4, 6)	40,1±3,7 (2, 3, 4)	0,12±0,04 (4, 5, 6)	27,4±1,8 (2, 4, 5)
Т-2 токсин	107±13	28,8±3,5 (1)	0,10±0,02 (3, 4)	23,4±2,1 (1)
Т-2 токсин + <i>B. subtilis</i> 090 +	108±12	27,3±2,7 (1)	0,18±0,04 (2)	25,5±1,2
Т-2 токсин + <i>B. subtilis</i> 090 + <i>B. subtilis</i> 8130	90±9 (1)	34,0±4,9 (6)	0,25±0,06 (1)	23,3±1,6 (1)
НТ-2 токсин	109±7	3340±230	434±26	30,0±1,6 (1)
НТ-2 токсин + <i>B. subtilis</i> 090 +	88±11 (1)	44,0±3,8 (5, 7)	0,23±0,04 (1)	30,0±1,7
НТ-2 токсин + <i>B. subtilis</i> 090 + <i>B. subtilis</i> 813	112±12	32,1±2,4 (1, 6)	0,22±0,02	28,4±1,7

епоксидгідролази, що синтезуються *B. subtilis*, здійснюють детоксикацію Т-2 і НТ-2 токсинів, впливаючи на різні хімічні групи молекул цих мікотоксинів.

Висновки.

1. Споживання курчатами корму, що містить Т-2 токсин у концентрації 10 мг/кг, викликає зниження середньодобового приросту маси на 31%, збільшення відносної маси серця, підшлункової залози і нирок, зменшення відносної маси органів кровот-

ворення селезінки і бурси, а також зниження концентрації загального білка і креатиніну в сироватці крові.

2. Наявність у кормі для курчат НТ-2 токсину в концентрації 16 мг/кг приводить до зниження середньодобового приросту живої маси на 14%, а також впливає на стан нирок, що проявляється в збільшенні їхньої відносної маси і підвищенні концентрації сечової кислоти і креатиніну в плазмі крові.

3. Препарат бактерій *B. subtilis* 090

позитивно впливає на середньодобовий приріст живої маси, відносну масу серця, нирок і концентрацію загального білка в плазмі крові при Т-2 і НТ-2 токсикозах курчат.

4. Спільне застосування препарату бактерій штамів *B. subtilis* 090 і *B. subtilis* 8130 при Т-2 і НТ-2 токсикозах курчат нормалізує масу тіла, відносну масу серця та вміст креатиніну в плазмі крові.

ЛІТЕРАТУРА

1. Труфанов О. В. НТ-2 токсин распространённый фактор загрязнения зерна в Украине // Птахівництво. — 2005. — Вип. — 57. — С. 450-454.
2. Котик А. М., Труфанова В. О., Труфанов О. В. Частота обнаружения Т-2 токсина, НТ-2 токсина, дезоксиниволена, зеараленона и фумонизинов в различных кормовых субстратах // Птахівництво. — 2006. — Вип. 58. — С. 556-562.
3. Wyatt R. D., Doerr J. A., Hamilton P. B., Burmeister H. R. Egg production, shell thickness, and other physiological parameters of laying hens affected by T-2 toxin // Appl. Microbiol. — 1975. — 29, N. 5. — P. 641-645.
4. Middelbrook J. L., Leatherman D. L. Binding to T-2 toxin to eukaryotic cell ribosomes // Biochem. Pharmacol. — 1989. — Vol. 38, N. 18. — P. 3103-10.
5. Taylor M. J., Pang V. F., Beasley V. R. The immunotoxicity of trichothecene mycotoxins / In: Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiological effects. - Florida: CRC Press, Boca Raton, — 1989. — Vol. II, pp. 1 — 37.
6. Котик А. М., Труфанов О. В. Корми: корисні, якісні, безпечні. // Ексклюзив агро. 2007. — № 1. — С. 46-49.
7. Paskevicius A., Bakutis B., Baliukonienė V., Sakalytė J. The search for ecologically safe means of mycotoxin detoxification in fodder // Ekologija. — 2006. — N. 3. — P. 128-131.
8. Avantiaggiato G., Solfrizzo M., Visconti A. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of Fusarium mycotoxins // Food Addit. Contam. — 2005. — Vol. 22, N. 4. — P. 379-88.
9. Труфанов О. В. Современные методы обеззараживания зерна и комбикормов, загрязнённых микотоксинами // Ефективні корми та годівля. — 2007. — № 4. — С. 17-21.
10. Binder E. — M., Binder J. Strain of eubacterium that detoxifies trichothecenes / U.S. Patent N. 6794175 B1, — 2004.
11. Takahashi-Ando N., Ohsato S., Shibata T. et al. Metabolism of zearealenone by genetically modified organisms expressing the detoxification gene from *Clonostachys rosea*. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. — Vol. 70, N. 6. — P. 3239-3245
12. Duvick J., Rood T., Wang X. Fumonisin detoxification enzymes / U.S. Patent N. 5716820, 1998.
13. Poppenberger B., Adam G., Berthiller F., Krska R. et al. Method for detoxification of mycotoxins // U.S. Patent N. 0183202 A1, — 2006.
14. Priest F. G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus* // Bacteriol. Rev. — 1977. — Vol. 41, N. 3. — P. 711-753.
15. Ramos H. C., Hoffmann T., Marino M. et al. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression // J. Bacteriol. — 2000. — Vol. 182, N. 11. — P. 3072-3080.
16. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions // Molecular microbiology. — 2005. — Vol. 56, N. 4. — P. 845-857.
17. Бойко Н. В., Карганян А. К., Петенко А. И. Биотехнологические решения: безопасность и продуктивность птицы // Птахівництво. — 2006. — Вип. 58. — С. 202-207.
18. Котик А. Н., Чернобай В. Т., Комисаренко Н. Ф., Труфанова В. А. Выделение микотоксина *Fusarium sporotrichiella* и изучение его физико-химических свойств // Микробиол. журн. — 1979. N. 41, вып. 6. — С. 636-639.
19. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2001. — 408 с.
20. Cundliffe E., Cannon M., Davis J. Mechanism of inhibition of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins // Proc. N. Acad. Sci. USA. — 1974. — Vol. 71, N. 1 — P. 30-34.
21. Cundliffe E., Davis J. Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins // Antimicrob. agents chemotherapy. — 1977. — Vol. 11, N. 3. — P. 491-499.
22. Brody M. S., Vijay K., Price C. W. Catalytic function of an α/β hydrolase is required for energy stress activation of the σ^B transcription factor in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. — 2001. — Vol. 183, N. 21. — P. 6422-6428.
23. Petersohn A., Brigulla M., Haas S., Hoheisel J. D., Volker U., Hecker M. Global Analysis of the General Stress Response of *Bacillus subtilis* // Ibid. — 2001. — Vol. 183, N. 19. — P. 5617-5631.

О. В. Труфанов

ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ *BACILLUS SUBTILIS* ПРИ Т-2 — И НТ-2 ТОКСИКОЗАХ ЦЫПЛЯТ

Потребление в течение 31 дня цыплятами корма, содержащего Т-2 токсин в концентрации 10 мг/кг, вызвало снижение среднесуточного привеса на 31%, увеличение относительной массы сердца, поджелудочной железы и почек, уменьшение относительной массы органов кроветворения — селезенки и бursы, а также снижение концентрации общего белка и креатинина в плазме крови. Наличие в корме для цыплят НТ-2 токсина в концентрации 16 мг/кг привело к снижению среднесуточного привеса на 14%, а также оказало негативное воздействие на состояние почек, которое выражалось в увеличении их относительной массы и повышении концентрации мочевой кислоты и креатинина в плазме крови. Препарат бактерий штамма *Bacillus subtilis* 090 ("Моноспорин ПК") оказывал положительное действие на среднесуточные привесы, относительную массу сердца, почек и концентрацию общего белка в плазме крови при Т-2 и НТ-2 токсикозах цыплят. Совместное применение пробиотических препаратов *B. subtilis* 090 и *B. subtilis* 8130 ("Бацелл") при Т-2 и НТ-2 токсикозах цыплят нормализовало массу тела, относительную массу сердца и содержание креатинина в плазме крови.

O. V. Trufanov

PROPHYLACTIC EFFECT OF *BACILLUS SUBTILIS* ON T-2 — AND HT-2 TOXICOSES OF CHICKENS

Consumption of the feed with T-2 toxin (10 ppm) by chickens for 31 days resulted in decreasing of average daily weight gain on 31%, increasing of kidney, pancreas and heart relative weight, decreasing of bursa and spleen relative weight, decreasing of total protein and creatinine content in blood plasma. The feed contained 16 ppm of HT-2 toxin caused decreasing of average daily weight gain on 14% and had negative influence on chicken's kidney that expressed in increasing of its relative weight and rising of uric acid and creatinine content in blood plasma. Probiotic preparation "Monosporin PK" based on *Bacillus subtilis* 090 strain acted positively on value of average daily weight gain, heart and kidney relative weight and total protein concentration under T-2 and HT-2 toxicoses. Combined application of *B. subtilis* 090 and *B. subtilis* 8130 (enzymatic drug "Bacell") for T-2 and HT-2 toxicoses treatment led to normalization of body weight, heart relative weight and creatinine content in blood plasma.