На правах рукописи

МУХАРЛЯМОВА АЙСЫЛУ ЗАВДАТОВНА

ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ РЕТИНОЛА АЦЕТАТА И ЦЕОЛИТА ПРИ ПОСТУПЛЕНИИ В ОРГАНИЗМ ЖИВОТНЫХ КОРМОВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ АФЛАТОКСИНОМ В1

4.2.2. Санитария, гигиена, экология, ветеринарно-санитарная экспертиза и биобезопасность

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)

Научный руководитель: **Тремасова Анна Михайловна**
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Бачинская Валентина Михайловна** – доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры паразитологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»

Герунов Тарас Владимирович – доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры диагностики, внутренних незаразных болезней, фармакологии, хирургии и акушерства ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»

Защита диссертации состоится «22» мая 2024 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета 35.2.016.02 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» по адресу: 420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и на сайте http://kazanveterinary.ru

Автореферат разослан « » _____ 2024 г. и размещен на сайтах: http://www.vak.ed.dov.ru и http://www.kazanveterinary.ru

Ученый секретарь
диссертационного совета Ленар Рафикович Загидуллин

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Основная цель сельскохозяйственной науки и практики заключается в получении и снабжении населения безопасными и высококачественными продуктами как животного, так и растительного происхождения. Но в то же время получение хорошего результата при решении этой проблемы ограниченно из-за неблагоприятного состояния окружающей среды, загрязненной экотоксикантами техногенного и природного происхождения (Дорожкин В.И. и соавт., 2018; Папуниди К.Х. и соавт., 2017; Семенов Э.И. и соавт., 2021). При этом наибольшую опасность представляют микотоксины.

Микотоксины являются токсичными продуктами, которые выделяются в результате процесса жизнедеятельности микроскопическими (плесневыми) грибами и представляют угрозу для здоровья животных и населения (Мирошниченко П.В. и соавт., 2020; Семененко М.П. и соавт., 2019; Семенов Э.И. и соавт., 2018; Тремасов М.Я. и соавт., 2016). На данный момент рядом авторов такими как Папуниди К.Х. и соавт. (2018), Пинюгин А.В. и соавт. (2018), описано более 300 разнообразных микотоксинов. При их поступлении в организм вместе с кормом или кормовым сырьем у млекопитающих и птиц выявляются токсические явления различной степени тяжести (Сурай П.Ф., 2017; Тремасов М.Я., 2002; Чулков А.К. и соавт., 2007; Шкуратова И.А. и соавт., 2019; Wang Y. et. al., 2021). В работах (Жестков Н.Н. и соавт., 2015; Потороко И.Ю. и соавт., 2020; Шкуратова И.А. и соавт., 2020; Shi H. et al., 2018) отмечено, что не менее одной четвертой части, производимой в мире сельскохозяйственной культуры поражено этими биологическими контаминантами, обладающими разной структурой и свойствами, изученными не в полной мере, и перечень данных загрязнителей возрастает в результате новых открытий, сделанных исследователями в этом направлении.

Среди микотоксинов наибольшее внимание уделяется афлатоксинам. Анализ отечественной и зарубежной литературы свидетельствует о существенной угрозе вреда здоровью животных и человека, который могут нанести афлатоксины (Кузнецов А.Ф., 2001; Тутельян В.А., Кравченко Л.В., 1985; Accinelli C. et al., 2018; Zhang Z.Y. et al., 2021; Li G. et al., 2021).

Данные полученные Антиповым В.А. и соавт. (2007), Брылиным А.П. (2019); Тремасовым М.Я. и соавт. (2012), Barati M. et al. (2018), указывают на то, что корма, загрязненные афлатоксинами, вызывают у животных комплексные отравления от острой степени тяжести до хронической, при которой падает естественная резистентность, иммунный статус, что является фактором, повышающим предрасположенность к

болезням инфекционной и незаразной этиологии, что влечет за собой ухудшение сохранности, продуктивности и качества продукции животного происхождения.

Это свидетельствует о необходимости совершенствования профилактических мероприятий и поиска эффективных факторов, способных снижать токсическое действие афлатоксинов и улучшать ветеринарно-санитарные показатели мяса. Поэтому актуальность темы и ее разработка представляет, как теоретический, так и практический интерес.

Степень разработанности темы. На сегодняшний день для обнаружения афлатоксинов в пищевой продукции, продовольственном сырье и кормах применяют следующие методы: тонкослойная хроматография, иммуноферментный анализ, жидкостная хроматография (Чернова А.В. и соавт., 2023). Однако, отсутствуют утвержденные методы определения афлаткосинов в биологическом материале (печени, мышечной ткани, крови и т д). Ввиду пагубного влияния афлатоксина на состояние здоровья животных, от которого зависит их продуктивность и качество животноводческой продукции, приняты нормативные положения. Установлены предельно-допустимые концентрации микотоксина в пищевых и кормовых продуктах (Иванов А.В. и соавт., 2008; Науменко Н.В. и соавт., 2019; Подлесных Д.К., 2019; Abd El-Kader M.F. et al., 2021; Akinola S.A. et al., 2021; Tamilmani T. et al., 2021).

Несмотря на то, что к настоящему времени накоплен значительный материал, свидетельствующий о способности некоторых витаминов изменять биологическую активность афлатоксинов, данные о влиянии витамина А на их токсические эффекты малоизучено. Показано, что избыток витамина А в рационе не оказывал какого-либо влияния на токсическое действие на организм афлатоксина (Newberen P., Suphakarn V., 1977) и, в то же время, было отмечено усиление токсического действия данного токсина как при недостатке, так и при избытке витамина А (Bryden W. Et al., 1979). При этом Д. Диаз (2006) отмечает, что введение в корм ретинола снижает уровень переокисления липидов при микотоксикозах.

Поиском средств, направленных на профилактику афлатоксикозов занимаются многие ученные, как российские, так и зарубежные. Для снижения чувствительности животных к действию афлатоксинов применяют пищевые компоненты, фармакологические средства, сорбенты и др. Использование энтеросорбентов является одним из основных методов для детоксикации организма. Следует учитывать, что эффективность сорбции определяют с одной стороны различные свойства микотоксинов, с другой различная природа сорбента. Однако для получения продукции с улучшенными качественными показателями, помимо детоксикации организма необходимо применять

средства, обладающие антиоксидантной активностью, способностью активизировать защитные механизмы организма животных.

Ввиду отсутствия данных по изучению ветеринарно-санитарной экспертизы мяса животных на фоне применения ретинола ацетата и цеолита в том числе при афлатоксикозе и в связи с актуальностью данной проблемы были проведены настоящие исследования.

Цель и задачи. Целью исследования явилось изучение влияния ретинола ацетата и цеолита на организм животных и ветеринарно-санитарные показатели мяса в том числе и при афлатоксикозе.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие задачи:

1. Провести мониторинг экотоксикантов (техногенных и природных) в объектах окружающей среды, зерновых культурах и кормах для сельскохозяйственных животных;

2. Разработать оптимальную схему пробоподготовки биологического материала для последующего определения остаточных количеств афлатоксина В1 методом жидкостной хроматографии;

3. Изучить влияние ретинола ацетата и цеолита на динамику живой массы, морфо-биохимические показатели крови, неспецифическую резистентность животных в том числе и при афлатоксикозе. Определить остаточные количества афлатоксина В1 в печени и мышечной ткани животных;

4. Установить влияние ретинола ацетата и цеолита на органолептические, физико-химические и бактериологические показатели мяса животных при афлатоксикозе;

5. Рассчитать экономическую эффективность выращивания поросят с применением ретинола ацетата и цеолита на фоне основного и токсичного рациона.

Научная новизна. Разработана оптимальная схема пробоподготовки с применением твердофазной экстракции для определения остаточных количеств афлатоксина В1 в биологическом материале с последующим определением методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с флуориметрическим детектированием.

Впервые экспериментально обоснована эффективность совместного введения в рацион ретинола ацетата и цеолита при афлатоксикозе. Установлено, что применение витамина А и цеолита способствуют уменьшению негативного эффекта в следствии функциональной и материальной кумуляции афлатоксина, что выражается в нормализации клинического проявления и исследованных показателей крови. Выявлено, что мясо поросят, получавших комбикорм, содержащий афлатоксин В1 с дополнительным введением ретинола ацетата и цеолита, по ветеринарно-санитарным показателям не отличалось от таковых в мясе здоровых животных. Доказана целесообразность

добавления в рацион поросят ретинола ацетата и цеолита для улучшения морфо-биохимических показателей, иммунологического статуса, продуктивности и качества мяса. Материалы данной диссертации могут расширить имеющиеся в ветеринарной практике мероприятия по профилактике афлатоксикоза. Доказана экономическая эффективность применения ретинола ацетата и цеолита на фоне основного и токсичного рациона поросят.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработанный способ определения афлатоксина В1 методом ВЭЖХ позволяет контролировать его остаточное содержание в органах и тканях сельскохозяйственных животных, что расширяет спектр возможностей по контролю качества пищевой продукции.

Выполненные исследования и полученные результаты дают теоретические и практические представления об изменениях морфологических, биохимических параметров крови, также показателей естественной резистентности, органолептических, физико-химических и бактериологических параметрах мяса животных при афлатоксикозе на фоне применения ретинола ацетата и цеолита; позволяют рекомендовать включить в рацион животных ретинола ацетат и цеолит при отравлении афлатоксином В1 для снижения отрицательного влияния данного токсина на организм животных, что положительно сказывается на качестве продуктов их убоя. Данные, полученные в ходе исследований, дают возможность усовершенствовать процесс выращивания поросят, повысить продуктивность и улучшить качество мясной продукции.

Разработаны «Методические рекомендации по определению афлатоксинов в биологическом материале методом высокоэффективной жидкостной хроматографии».

Полученные результаты научно-исследовательской работы используются в учебном процессе (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Россия; ФГБОУ ВО МарГУ, г. Йошкар-Ола, Россия).

Методология и методы исследования. Методология исследования состояла из выполнения работы в несколько этапов с теоретическим обоснованием выбора диссертационной темы.

Теоретической базой диссертационной работы явились работы российских и зарубежных ученых, посвященных проблеме афлатоксикоза.

Для достижения поставленных задач использован комплекс методов, включающих общетеоретические и эмпирические методы, а также комплекс специальных клинических, морфо-биохимических, иммунологических, хроматографических и ветеринарно-санитарных методов.

Основные положения, выносимые на защиту:

– мониторинговыми исследованиями выявлено наличие экотоксикантов, как природного, так и техногенного происхождения в объектах окружающей среды, зерновых культурах и кормах для сельскохозяйственных животных;

– предложенный способ позволяет эффективно определять остаточные количества афлатоксина В1 в печени и мышечной ткани;

– ретинола ацетат и цеолит оказывают положительный эффект на изучаемые параметры, способствуют повышению иммунного статуса и улучшению ветеринарно-санитарных показателей мяса.

Личный вклад автора. Диссертантом совместно с научным руководителем разработаны основные направления научного исследования, сформулирована цель, поставлены задачи исследовательской работы. Автором самостоятельно проанализированы данные научной литературы, освоены методы исследований, проведены анализ и обработка полученных результатов, сформулированы выводы.

Степень достоверности и апробация материалов диссертации. Исследования проводились на достаточном по объему материале, который был обработан с применением современных методик и оборудования, согласно утвержденному плану.

Результаты экспериментальных данных, являющиеся основой диссертации, доложены, обсуждены и одобрены на ежегодных сессиях ученого совета ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» по рассмотрению отчетов о НИР (Казань, 2019-2023), также Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки сельского хозяйства: Мосоловские чтения» (Йошкар-Ола, 2019, 2020), Международной научной конференции «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (Минск, 2021), Международной научно-практической конференции «Наука, технологии, кадры – основы достижений прорывных результатов в АПК» (Казань, 2021), Международной научно-практической конференции «Современные проблемы экспериментальной и клинической токсикологии, фармакологии и экологии» (Казань, 2021), Международной научно-практической конференции «Глобальные вызовы развития естественных, технических и гуманитарных наук» (Белгород, 2022). Достоверность полученных результатов также подтверждается публикациями в рецензируемых научных изданиях, в том числе из перечня ВАК и Scopus, методическими рекомендациями.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ;

1 статья в издании, цитируемой в базе данных Scopus, а также 1 методическая рекомендация.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 157 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, основного содержания работы (включающего в себя материалы и методы и результаты собственных исследований), заключения, практических предложений, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений. Работа иллюстрирована 17 таблицами, 29 рисунками. Список использованной литературы включает 279 литературных источников, из них 100 - зарубежных авторов.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» в лаборатории физико-химического и прецизионного анализа отделения токсикологии в период с 2019-2023 гг.

Результаты апробированы на поросятах КФХ «Рыжов Ю.П.» Пестречинского района Республики Татарстан

Объектами изучения являлись 36 кроликов породы Шиншилла, 60 поросята белой крупной породы, 346 образцов зерновых культур, 273 образца комбикорма, 18 образцов почвы и 6 образцов поверхностных вод. Предметом изучения диссертационной работы был биоматериал подопытных животных (кровь и её сыворотка, также паренхиматозные внутренние органы).

При экспериментальном афлатоксикозе для затравки лабораторных животных использовали афлатоксин В1 кристаллической формы производства Sigma-Aldrich (США). В условиях хозяйства животные получали корм естественно зараженный афлатоксином В1 в количестве 150 мкг/кг.

В качестве средства профилактики при афлатоксикозе применяли 3,44% масляный раствор ретинола ацетата и цеолит Татарско-Шатрашанского месторождения Республики Татарстан, представляющий собой кристаллический пористый алюмосиликат на основе клиноптилолита (62%).

Афлатоксин В1 вводили в рацион лабораторных (кролики) животных путем тщательного перемешивания и добавления в корм, либо в виде водных растворов внутрижелудочно при помощи атравматического зонда. Препарат ретинола ацетата животные опытных групп (кролики и поросята) ежедневно получали дополнительно к

основному рациону. Цеолит давали животным в хлебных болюсах из расчета 2% от рациона.

Для изучения динамики живой массы проводили взвешивание животных. Гематологические исследования проводили на гемоанализаторе «Mythic 18-Vet» (Франция). Биохимические показатели определены по Б.И. Антонову и соавт. (1991) и И.П. Кондрахину (2004). Активность ферментов АСТ и АЛТ, количество глюкозы определяли с помощью биохимического анализатора «Microlab 300- Vet» (Нидерланды). Показатели фагоцитоза определяли по С.А. Кост и М.И. Стенко (1974). Лизоцимную активность сыворотки крови по В.Г. Дорофейчуку (1968).

Органолептические показатели устанавливали в соответствии с ГОСТ 7269-2015. Химические и микроскопические анализы мяса проводили на основании ГОСТ 23392-2016.

Остаточные количества афлатоксина В1 устанавливали методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием. Уровень витамина А в сыворотке крови определяли по модифицированному методу K. Hosotani, M. Kitagawa (2003). Пестициды по методу (Фицев И.М. и соавт., 2021) и по методу (Melo M.G. et al., 2020).

Расчет экономической эффективности проводили по методике И.Н. Никитина с учетом актуализированных цен.

Обработку данных, полученных экспериментальным путем, проводили методом вариационной статистики с применением критерия достоверности по Стьюденту с использованием специальных программ. Разница между сравниваемыми величинами считалась достоверной при уровнях р меньше или равной 0,05.

2.2 Результаты собственных исследований

2.2.1 Исследование уровня загрязнения объектов окружающей среды, зерновых культур и кормов пестицидами и микотоксинами

Установили, что в образцах почв из-под сельхозугодий (подсолнечник, пшеница, картофель) обнаружен дикват. При этом отметили, что в одном образце его содержание было выше МДУ на 25%.

В образцах природных поверхностных вод пестицидов обнаружено не было. Результаты определения загрязненности зерновых культур пестицидами и микотоксинами показали, что 6,9% проб было положительным по данным показателям. Выявлены следующие пестициды: циперметрин, прометрин, тиаметоксам, имидаклоприд, 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, тебуконазол и хлорпирифос. Обнаружены микотоксины:

зеараленон, Т-2 токсин, афлатоксин В1, охратоксин А и дезоксиниваленол. Следует отметить, что уровень микотоксинов и пестицидов не превышал МДУ.

В ходе исследования уровня загрязнения кормов для сельскохозяйственных животных (птицы, свиней и КРС) вторичными метаболитами микроскопических грибов установили, что 24,2% проб содержали микотоксины: зеараленон, Т-2 токсин, афлатоксин В1, фумонизин В1 и дезоксиниваленол. При этом в 8,1% проб отметили превышение допустимого уровня микотоксинов.

2.2.2 Разработка способов индикации афлатоксина В1 и витамина А в биологической матрице

2.2.2.1 Оптимизация условий пробоподготовки и режима хроматографирования витамина А в сыворотке крови и печени животных

Влияние температуры и времени инкубирования. Отмечено, что для лучшего извлечения на стадии инкубировании оптимальным является температура 75 °С.

Влияние концентрации раствора гидроксида калия. Процесс сапонификации был осуществлен с различными концентрациями раствора гидроксида калия: 10 М; 15 М; 20 М и 25 М. Установлено, что наиболее приемлемым оказался 20 М раствор гидроксида калия.

Влияние продолжительности центрифугирования. Установлено, что оптимальным условием является центрифугирование проб в течение 5 минут. При проведении экстрации витамина А из сыворотки крови была исключена стадия сапонификации, что позволило уменьшить время обработки пробы и стоимость анализа.

Хроматографические исследования. Хроматографическое разделение было выполнено при комнатной температуре в изократическом режиме. В качестве подвижной фазы для хроматографической колонки Reprosil ODS-A C18 был выбран чистый ацетонитрил при скорости потока 1,5 мл/мин и объеме вводимой пробы 20 мкл. Детектирование проведено при длине волны – 325 нм

2.2.2.2 Подбор условий пробоподготовки патологического материала для извлечения афлатоксина В1

Экстракция афлатоксина В1. Установлено, что для образцов печени и мышечной ткани массой в 10 г достаточно 30 мл дихлорметана. Наиболее подходящее время экстракции составило 35 минут (Рис. 1а).

Подбор сорбента для очистки экстракта. Установили, что очистка экстракта с применением картриджа Oasis HLB является оптимальным для получения высокой и стабильной степени извлечения афлатоксина (Рис. 1б).

Подбор условий реакции дериватизации. В качестве раствора при проведении процесса дериватизации наиболее подходящим оказался 10% раствор ACN. Установили, что оптимальным является проведение реакции при 60 °С в течении 10 мин (Рис. 1в).

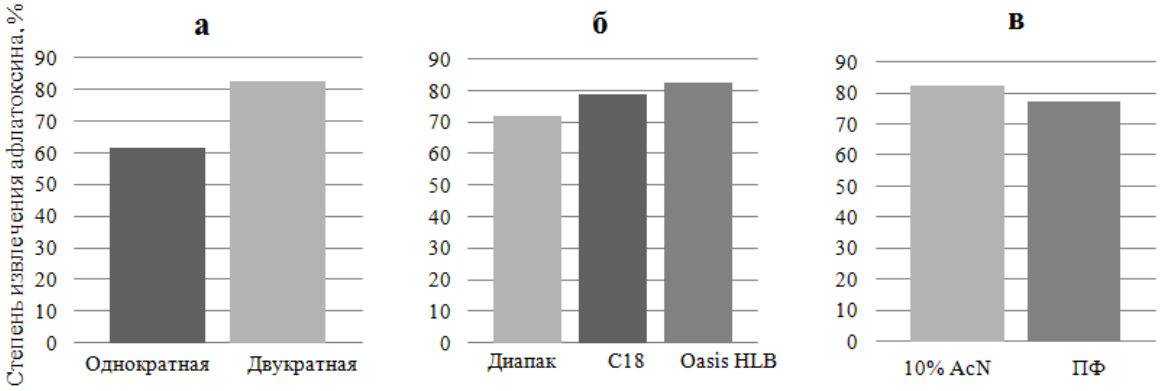

Рисунок 1 – Зависимость степени извлечения афлатоксина B1 из печени и мышечной ткани от *а*) количества экстракций; *б*) влияния сорбентов Oasis HLB, C18, Диапак; *в*) влияния раствора при реакции дериватизации.

2.2.2.3 Установление метрологических характеристик ВЭЖХ метода определения афлатоксина B1

Установлены основные метрологические характеристики метода: специфичность, линейность, чувствительность, точность или прецизионность. В таблице 1 представлены аналитические характеристики метода.

Таблица 1 – Аналитические характеристики определения афлатоксина B1 методом ВЭЖХ

Определяемое соединение	Предел обнаружения, мкг/кг	Предел определения, мкг/кг	Диапазон линейности ГГ, мкг/мл	r^2	R, % (n=3, p=0,95)?
Афлатоксин B1	5	15	0,05-1,0	0,999	82,4±8

Примечание: ГГ – градуировочный график

Таким образом, принимая во внимание все вышеперечисленные параметры, метод ВЭЖХ-ФЛД и процедуру пробоподготовки, использованную в этом исследовании, можно рассматривать как селективную, точную и надежную для определения афлатоксинов в биологическом материале.

2.2.3 Результаты лабораторных испытаний на кроликах

Опыты проведены на 36 кроликах породы Шиншилла живой массой 2,3-2,4 кг, разделенных по принципу аналогов на 6 групп. Первая группа – биологический контроль

(БК). Животным второй (АфВ1), третьей (АфВ1 + в.А 175 МЕ), четвертой (АфВ1 + в.А 375 МЕ) и пятой (АфВ1 + в.А 375 МЕ + Ц2%) групп задавали в течение 25 сут (в период с 30-х по 55 сут) корм, искусственно контаминированный афлатоксином В1 в количестве 75 мкг/кг корма. Кроликам третьей и четвертой группы на протяжении всего опыта (55 сут) дополнительно вводили в рацион препарат ретинола ацетата в количестве 175 и 375 МЕ/кг живой массы, соответственно. Пятая группа животных совместно с препаратом ретинола ацетат в количестве 375 МЕ/кг живой массы получала цеолит из расчета 2% от рациона. Шестая группа (БК + в.А 375 МЕ + Ц2%) получала основной рацион, ретинола ацетат (375 МЕ/кг живой массы) и цеолит (2% от рациона). Учетный период опыта составил 55 дней.

2.2.3.1 Санитарно-гигиенические характеристики условий содержания экспериментальных кроликов в условиях вивария

Основные показатели микроклимата экспериментальных помещений были следующие: температура воздуха (16,6±1,42) °С, относительная влажность (77,7±0,62)%, скорость движения воздуха (0,39±0,03) м/с, содержание углекислого газа в воздухе (0,14±0,05)%, уровень сероводорода (0,011±0,02) мг/м^3, аммиак не выявлен. Полученные показатели соответствовали правилам содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами [ГОСТ 33216-2014].

Кормление животных, с момента начала карантина и до окончания исследования осуществляли при условии свободного доступа кроликов к питьевой воде, грубым (сено разнотравное) и концентрированным кормам.

2.2.3.2 Морфо-биохимические показатели крови кроликов при экспериментальном афлатоксикозе на фоне применения ретинола ацетата и цеолита

Отметили, что масса тела кроликов (группа АфВ1) увеличивалась незначительно и в конце опыта была ниже на 20,9% ($p<0,05$) в сравнении с группой БК. В тоже время в группе кроликов, содержащихся на «токсичном» рационе с применением ретинола ацетата и цеолита (АфВ1 + в.А 375 МЕ + Ц2%), прирост живой массы несущественно отличался от контрольных аналогов. Наибольший прирост живой массы был отмечен у кроликов шестой группы, где среднесуточный прирост был на 11,6% больше, по сравнению с группой БК.

Анализируя данные по морфологическим показателям крови кроликов (Табл. 2), установили, что во второй, третьей и четвертой группе животных количество эритроцитов статистически значимо снижалось на 55 сут на 23,0 ($p<0,01$); 19,2 ($p<0,05$) и 16,3% ($p<0,05$); лейкоцитов – на 18,6 ($p<0,01$); 15,1 ($p<0,01$) и 13,5% ($p<0,01$); гемоглобина – на

14,1 (p<0,01); 9,3 (p<0,05) и 7,4% (p<0,05), соответственно, по сравнению с исходными данными. Содержание эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина в пятой группе уменьшилось на 7,4; 7,7 (p<0,05) и 3,2%. В шестой группе кроликов к концу эксперимента отметили незначительный рост количества эритроцитов (на 4,3%), лейкоцитов (на 1,2%) и гемоглобина (на 8,9%) по отношению к исходным данным.

Количество общего белка во второй группе уменьшилось на 55 сут на 25,2% (p<0,001); концентрация γ-глобулинов понизилась на 5,5% относительно фона. Эффективность применения ретинола ацетата и цеолита при афлатоксикозе отметили в пятой группе, где общий белок уменьшился на 8,1% (p<0,01); уровень γ-глобулинов понизился на 2,6%. У кроликов шестой группы, содержащихся на ОР с дополнительным введением ретинола ацетата и цеолита, количество общего белка увеличилось на 5,63%; концентрация γ-глобулинов – на 3,4%.

Таблица 2 – Морфологические показатели крови кроликов при афлатоксикозе и на фоне применения ретинола ацетата и цеолита (n=6)

Группа животных	Показатель		
	Лейкоциты, 10^9 /л	Эритроциты, 10^{12} /л	Гемоглобин, г/л
Исходные данные			
БК	9,42±0,20	5,43±0,21	125,48±1,88
АфВ1	9,54±0,21	5,35±0,19	119,43±1,43
АфВ1 + в.А 175 МЕ	9,39±0,19	5,46±0,18	122,43±2,16
АфВ1 + в.А 375 МЕ	9,28±0,18	5,29±0,22	121,23±2,50
АфВ1 + в.А 375МЕ + Ц2%	9,46±0,19	5,38±0,20	122,80±1,72
БК + в.А 375 МЕ + Ц2%	9,31±0,21	5,41±0,18	123,56±2,41
55 сут			
БК	9,41±0,17	5,44±0,18	123,92±1,67
АфВ1	7,76±0,16**	4,12±0,16**	102,57±1,81**
АфВ1 + в.А 175 МЕ	7,97±0,19**	4,41±0,18*	111,08±1,92**
АфВ1 + в.А 375 МЕ	8,03±0,18**	4,43±0,17*	112,22±1,83**
АфВ1 + в.А 375МЕ + Ц2%	8,73±0,17*	4,98±0,19	118,87±2,05
БК + в.А 375 МЕ + Ц2%	9,42±0,19	5,64±0,18	134,61±2,56

Примечание: * - P<0,05; ** - P<0,01

Результаты исследований активности АСТ и АЛТ показали увеличение на 55 сут опыта во второй группе животных на 12,7% и 36,8% (p<0,05); соответственно. Наиболее благоприятное влияние ретинола ацетата и цеолита при афлатоксикозе отметили в пятой группе, где активность АСТ и АЛТ была выше относительно фона на 3,0 и 5,4%. Исследование ферментов печени, шестой группы показало, что при добавлении в их рацион ретинола ацетата и цеолита каких-либо изменений, данных показателей не установлено. В ходе проведенного опыта установлено, что ретинола ацетат и цеолит

улучшили морфо-биохимический статус у кроликов и стимулировали белковый обмен в их организме.

2.2.3.3 Показатели неспецифической резистентности кроликов при экспериментальном афлатоксикозе на фоне применения ретинола ацетата и цеолита

Результаты по исследованию показателей неспецифической резистентности показали, что во всех опытных группах с применением «токсичного корма» происходило снижение обсуждаемых показателей. Снижение естественной резистентности у кроликов, которые при афлатоксикозе получали ретинола ацетат и цеолит, было менее выражено. Так, фагоцитарная активность в 5 группе была ниже на 2,9%; активность лизоцима – на 8,8% относительно группы БК. В наших исследованиях результатом положительного влияния ретинола ацетата и цеолита на организм кроликов явилось увеличение обсуждаемых показателей в шестой опытной группе на 6,2 и 3,7%, соответственно, относительно контроля

2.2.3.4 Оценка остаточных количеств афлатоксина В1 в печени и мышечной ткани кроликов при экспериментальном афлатоксикозе на фоне применения ретинола ацетата и цеолита

После проведения декапитации животных из каждой группы на 55 сут опыта были взяты пробы печени и мышечной ткани для определения в них остаточных количеств афлатоксина В1. Наибольшая концентрация микотоксина была обнаружена у животных второй группы. Концентрация афлатоксина в печени в третьей и четвертой группе была ниже на 3,5 и 12,8%, в пятой группе – ниже на 65,6% ($p<0,001$). Аналогичные данные были получены при исследовании количества афлатоксина в мышечной ткани во второй, третьей и четвертой группах, при этом в пятой группе данный токсин не обнаружен. Таким образом введение в рацион кроликов ретинола ацетата и цеолита при смоделированном афлатоксикозе предотвращает накопление афлатоксина в органах животных и способствует получению доброкачественной продукции.

2.2.4 Результаты научно-хозяйственных испытаний на поросятах

Опыты проводили в условиях КФХ «Рыжов Ю.П.». По аналоговым признакам из поросят крупной белой породы живой массой 24-27 кг были сформированы шесть групп по 10 голов в каждой. Первая группа служила биологическим контролем (БК). Животные второй (АфВ1), третьей (АфВ1 + в.А 240 МЕ), четвертой (АфВ1 + в.А 480 МЕ) и пятой групп (АфВ1 + в.А 480 МЕ + Ц2%) получали в течение 25 сут (с 30-х по 55 сут)

комбикорм из хозяйства, содержащий афлатоксин В1 в количестве 150 мкг/кг корма. Третья группа поросят на протяжении всего опыта в течение 55 сут дополнительно получала ретинола ацетат в количестве 240 МЕ/кг живой массы. Четвертая группа – ретинола ацетат в количестве 480 МЕ/кг живой массы. Пятая группа - ретинола ацетат в количестве 480 МЕ/кг живой массы и цеолит из расчета 2% от рациона. Шестая группа (БК + в.А 480 МЕ + Ц2%) – дополнительно к ОР получала ретинола ацетат в количестве 480 МЕ/кг живой массы и цеолит из расчета 2% от рациона. Длительность опыта составила 55 дней.

2.2.4.1 Санитарно-гигиенические характеристики условий содержания поросят в условия производственного опыта

Микроклимат помещений для содержания поросят характеризовался параметрами, находящимися в пределах нормативных значений. А именно: температура воздуха в помещении, где содержались опытные поросята была равной (22,7±0,64) ºС, относительная влажность составила (68,5±1,32)%, среднее значение скорости движения воздуха в период проведения эксперимента находилось на уровне (0,19±0,02) м/с. Концентрация вредных газов (NH_3, H_2S, CO_2) в воздухе не превышала рекомендуемых показателей. Кормление осуществляли полнорационным комбикормом для молодняка свиней произведенным ООО «Родник», включающим в свой состав отруби пшеничные, ячмень, овёс, шрот подсолнечный, дрожжи кормовые, известняковая мука, соль поваренная, фунгисорб, трикальций фосфат, премикс КС-4.

2.2.4.2 Морфо-биохимические показатели крови поросят при экспериментальном афлатоксикозе на фоне применения ретинола ацетата и цеолита

На начало опытов поросята всех опытных групп имели схожие значения показателя живой массы. К концу эксперимента отметили, что поросята первой и шестой групп набирали живую массу быстрее по сравнению с животными, рацион которых был загрязнен афлатоксином. Наибольший прирост живой массы установили у поросят шестой группы, которая превосходила значения группы биологического контроля на 12,3%.

Количество эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина относительно фоновых значений во второй группе уменьшилось на 24,8 ($p<0,01$); 18,4 ($p<0,05$) и 15,8% ($p<0,01$); в третьей – на 19,3 ($p<0,05$); 14,1 и 7,7% ($p<0,05$); в четвертой – на 17,2 ($p<0,05$); 12,3 и 5,2%, соответственно. В пятой группе животных, рассматриваемые показатели уменьшались незначительно. Благоприятное воздействие применяемых средств на морфологический

статус отметили и в шестой группе, где количество эритроцитов увеличилось на 4,8%, лейкоцитов – на 1,9%, гемоглобина – на 7,6%.

Во второй группе поросят отметили снижение общего белка на 25,7% ($p<0,01$); концентрации γ-глобулинов – на 5,8%. В третьей и четвертой группе общий белок уменьшился на 20,1 ($p<0,01$) и 18,2% ($p<0,01$); уровень γ-глобулинов – на 4,3 и 3,2%, соответственно. Профилактический эффект от применения ретинола ацетата и цеолита прослеживался в пятой группе, где общий белок понизился на 7,2%; γ-глобулины – на 1,2%. Количество общего белка в сыворотке крови у поросят шестой группы увеличилось к 55 сут на 5,9%; концентрации γ-глобулинов – на 3,1%.

Активность ферментов АСТ и АЛТ в группе животных, получавших «токсичный» корм была выше в сравнении с фоном на 15,3 ($p<0,01$) и на 41,4% ($p<0,01$), соответственно. В третьей группе – на 14,6 ($p<0,01$) и 38,5% ($p<0,01$); в четвертой – на 10,6 ($p<0,05$) и 28,0% ($p<0,01$). В пятой группе поросят активность АСТ и АЛТ увеличилась менее значительно, на 3,3 и 7,2%, соответственно. У поросят шестой группы каких-либо изменений обсуждаемых показателей относительно фона и контрольных аналогов не наблюдали.

Таким образом включение в рацион ретинола ацетата и цеолита оказывало благоприятное воздействие на морфо-биохимический статус, показатели белкового обмена, способствовало нормализации ферментативного профиля крови поросят, что предрасполагает к получению качественной продукции от данного вида животных.

2.2.4.3 Показатели неспецифической резистентности поросят при экспериментальном афлатоксикозе на фоне применения ретинола ацетата и цеолита

Снижение фагоцитарной активности в данной группе составило 9,5%; активности лизоцима – 17,6% ($p<0,05$). В третьей группе животных ФА уменьшалась на 8,3% и АЛ – на 13,4%; в четвертой – ФА на 7,2 и АЛ на 10,7%. В пятой группе животных отметили наиболее выраженный защитный эффект, так ФА нейтрофилов уменьшилась на 2,2%; АЛ – на 6,3%. В шестой опытной группе установили незначительный рост рассматриваемых показателей, так ФА была выше относительно контрольных аналогов на 6,5% и АЛ – на 3,9%. Основываясь на результатах проведенного опыта можно констатировать, что применение в рационах животных ретинола ацетата и цеолита повышает устойчивость организма и стимулирует факторы неспецифической резистентности поросят.

2.2.4.4 Оценка остаточных количеств афлатоксина В1 в печени и мышечной ткани поросят при экспериментальном афлатоксикозе на фоне применения ретинола ацетата и цеолита

Потребление поросятами корма, содержащего афлатоксин В1 привело к накоплению в печени данного токсина. Так, наибольшая концентрация микотоксина была зарегистрирована в группе животных, получавших «токсичный» корм. В пятой группе, где поросята получали совместно ретинола ацетат и цеолит, содержание микотоксина было ниже на 68,9% ($p<0,001$) в сравнении со второй группой. Аналогичные результаты были получены при хроматографическом исследовании мышечной ткани поросят, при этом в пятой группе афлатоксин не обнаружен. В результате проведенных исследований установлено, что совместное применение ретинола ацетата и цеолита значительно уменьшает содержание остаточных количеств исследуемого микотоксина в печени и мышечной ткани

2.2.5 Ветеринарно-санитарная оценка качества мяса поросят

2.2.5.1 Органолептическая оценка мяса поросят при экспериментальном афлатоксикозе на фоне применения ретинола ацетата и цеолита

При органолептическом исследовании установили, что мясо поросят первой, четвертой, пятой и шестой групп не имело существенных различий и отвечало требованиям, предъявляемым к свежему мясу в соответствии с ГОСТ 7269-2015. При этом органолептические показатели мяса поросят второй и третьей группы имело отклонения от предусмотренных норм.

2.2.5.2 Физико-химические и микроскопические показатели мяса поросят

Микроскопические показатели мяса считаются основными в установлении его качества. При микроскопии мазков-отпечатков (первая, четвертая, пятая и шестая группы) не выявили каких-либо отклонений от допустимых уровней ни в поверхностном, ни в глубоких слоях мышечной ткани. В оставшихся группах определили, что поверхность мышц была обсеменена не более 30 кокками и палочковидными бактериями; в глубоких слоях обнаружены единичные кокки и палочковидные бактерии.

Таблица 3 – Физико-химические показатели мяса поросят при афлатоксикозе и на фоне применения ретинола ацетата и цеолита (n=3)

Показатель	Группа животных					
	Первая	Вторая	Третья	Четвертая	Пятая	Шестая
pH	5,7±0,1	6,1±0,1	6,1±0,2	5,8±0,1	5,7±0,1	5,7±0,2
Реакция с сернокислой меди	Прозрач-ный	Мутный	Мутный	Прозрач-ный	Прозрач-ный	Прозрач-ный
Реакция на пероксидазу	+	-	-	+	+	+
Амино-аммиачный азот, мг	0,58±0,02	1,67±0,01	1,51±0,02	0,92±0,02	0,63±0,03	0,55±0,03

По результатам исследования (Табл. 3) отметили положительное влияние ретинола ацетата на изучаемые показатели при поступлении в организм животных кормов, загрязненных афлатоксином В1, при этом наиболее выраженное влияние установили в группе с применением ретинола ацетата и цеолита. Это указывает на интенсивность протекания процесса детоксикации в организме поросят и элиминации афлатоксина.

Таким образом, по результатам ветеринарно-санитарной экспертизы можно сделать заключение, что органолептические, физико-химические и микроскопические показатели мяса поросят при комплексном воздействии ретинола ацетата и цеолита, как при потреблении «токсичного» корма, так и без афлатоксина, соответствуют требованиям, предусмотренным для доброкачественного мяса.

2.2.6 Расчет экономической эффективности

Полученная в ходе профилактики афлатоксикоза поросят экономическая эффективность на 1 рубль дополнительных затрат составила 3 рубля 42 копейки. Экономическая эффективность применения ретинола ацетата и цеолита в рационе поросят без афлатоксина составила 2 рубля 79 копеек.

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Мониторинговыми исследованиями установлено, что зерновые культуры и корма для сельскохозяйственных животных содержат экотоксиканты, как природного, так и техногенного происхождения. Загрязненность зерновых культур афлаткосином составила 47,4%; кормов – 34,9% от положительных по наличию микотоксинов проб.

2. Разработана оптимальная схема пробоподготовки биологического материала для последующего определения остаточных количеств афлатоксина В1 методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием. Схема пробоподготовки включала следующие

стадии: измельчение, экстрагирование дихлорметаном, концентрирование, перерастворение в гексане, очистку экстракта с применением ТФЭ, концентрирование очищенного экстракта и хроматографический анализ афлатоксина после предварительной дериватизации.

3. Включение в рацион животных ретинола ацетата (375 МЕ/кг живой массы кроликов и 480 МЕ/кг живой массы поросят) и цеолита (2% от рациона) способствует нормализации морфо-биохимических параметров крови, показателей неспецифической резистентности и снижает накопление токсина в органах у кроликов и поросят на 65,6 и 68,9% ($p<0,001$); добавление испытуемых средств к основному рациону без афлатоксина оказывает положительное действие на росто-весовые показатели, улучшает интенсивность обменных процессов (у кроликов прирост живой массы увеличился на 11,6%; у поросят – на 12,3% относительно контрольных аналогов, общий белок у кроликов увеличился на 5,63%; у поросят – на 5,9% по сравнению с исходными значениями).

4. Установлено, что ретинола ацетата и цеолит не оказывают отрицательного воздействия на качество получаемой продукции, способствуют сохранению показателей пищевой ценности мяса. Мясо поросят, рационы которых были контаминированы афлатоксином В1 на фоне применения ретинола ацетата и цеолита, имеет органолептические и физико-химические показатели, соответствующие стандартам, предусмотренным для свежего мяса.

5. Экономическая эффективность на 1 рубль затрат от применения ретинола ацетата и цеолита на фоне афлатоксикоза составила 3 рубля 42 копеек; на фоне основного рациона без содержания токсина – 2 рубля 79 копеек.

3.1 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для определения остаточных количеств афлатоксина В1 в органах и тканях животного рекомендуется использовать разработанную схему пробоподготовки с последующей идентификацией методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием.

Результаты исследования включены в «Методические рекомендации по определению афлатоксинов в биологическом материале методом высокоэффективной жидкостной хроматографии».

На основании проведенных научно-хозяйственных опытов и полученных экспериментальных данных рекомендуется применять препарат ретинола ацетата при афлатоксикозе, а также для повышения продуктивных качеств, активизации защитных механизмов и неспецифической резистентности организма, в дозах: для кроликов – 375

МЕ на 1 кг живой массы, для поросят – 480 МЕ на 1 кг живой массы совместно с цеолитом в дозе 2% к рациону.

3.2 ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ

Перспективным направлением дальнейшей разработки темы является изучение применения ретинола ацетата и цеолита при загрязнении кормов афлатоксинами и другими микотоксинами, продолжение изучения эффективности их использования в рационах других видов животных и установление оптимальных дозировок.

Получение комплексной добавки в корма для сельскохозяйственных животных и её внедрение в животноводческие предприятия с целью коррекции последствий отравления афлатоксином В1, а также сохранения продуктивности и качества мясной продукции.

4 СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ

1. Мухарлямова, А.З. Морфологические и биохимические показатели крови кроликов при экспериментальном афлатоксикозе на фоне применения ретинола ацетата и цеолита / А.З. Мухарлямова, А.М. Тремасова, С.А. Танасева, Э.И. Семенов, П.В. Софронов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2019. - Т.238. - №2. - С. 133-138.

2. Мухарлямова, А.З. Определение уровня афлатоксина В1 и витамина А при афлатоксикозе кроликов / А.З. Мухарлямова // Вестник Марийского Государственного Университета. Серия «Сельскохозяйственные науки. Экономические науки». - 2020. - Т.6. - №2. - С. 187-192.

3. Мухарлямова, А.З. Определение уровня загрязнения кормов афлатоксином В1 / А.З. Мухарлямова // Вестник Марийского государственного университета. Серия: Сельскохозяйственные науки. Экономические науки. - 2023. - Т. 9, № 2(34). - С. 162-167.

В научных изданиях, входящих в базу данных Scopus

4. Фицев, И.М. Определение диквата и параквата методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в объектах экомониторинга / И.М. Фицев, А.Ю. Лихачева, А.М. Сайфутдинов, А.З. Мухарлямова, С.Л. Мохтарова, Ж.Р. Насыбуллина // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. - 2021. - Т.163. -№1. - С. 61-71.

В других научных изданиях

5. Мухарлямова, А.З. Метаболические изменения афлатоксина B_1 / А.З. Мухарлямова, Э.Р. Рахметова, А.М. Сайфутдинов // Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки сельского хозяйства: Мосоловские чтения: Матер. Междунар. науч-практич. конференции, Йошкар-Ола. - 2019. – Вып. XXI. – С. 429-431.

6. Мухарлямова, А.З. Ветеринарно-санитарная экспертиза мяса поросят при афлатоксикозе и на фоне лечения / А.З. Мухарлямова, А.М. Тремасова // Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки сельского хозяйства: Мосоловские чтения: Матер. Междунар. науч-практич. конференции, Йошкар-Ола. - 2020. – Вып. XXII. – С. 474-476.

7. Mukharlyamova, A.Z. The Complex Effect of Retinyl Acetate and Zeolite on the Resistance of Rabbits with Aflatoxicosis / A.Z. Mukharlyamova, A.M. Tremasova, A.G. Mukhammetshina, O.V. Shlyamina, A.R. Makaeva, S.A. Tanaseva, A.M. Saifutdinov, I.M. Fitsev, A.YU. Likhacheva, E.R. Rakhmetova, S.L. Mokhtarova, M.S Khakimov // Systematic Reviews in Pharmacy. – 2021. – Vol.12. – No3. – P. 251-253.

8. Мухарлямова, А.З. Защитное влияние витамина А при воздействии на организм афлатоксинов / А.З. Мухарлямова, А.М. Тремасова, И.М. Фицев // Физико-химическая биология как основа современной медицины: тезисы докладов участников Международной научной конференции, посвященной 75-летию со дня рождения профессора Е.В. Барковского, Минск, 2021. – С. 197-199.

9. Мухарлямова, А.З. Минимизация негативного влияния на организм кроликов афлатоксина В1 при совместном применении ретинола ацетата и цеолита / А.З. Мухарлямова, А.М. Тремасова, А.Г. Мухамметшина, М.В. Балымова // Современные проблемы экспериментальной и клинической токсикологии, фармакологии и экологии: Сборник тезисов докладов Международной научно-практической конференции, Казань. - 2021. – С. 180-181.

10. Мухарлямова, А.З. Мониторинг остаточных количеств пестицидов и микотоксинов в зерновых культурах / А.З. Мухарлямова, А.Г. Мухамметшина, Э.Р. Рахметова // Наука, технологии, кадры - основы достижений прорывных результатов в АПК: Сборник научно-практических Материалов Международной научно-практической конференции, Казань. - 2021. – С. 77-85.

Методические рекомендации

Методические рекомендации по определению афлатоксинов в биологическом материале методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / А.З. Мухарлямова, А.М. Тремасова, И.М. Фитцев, А.М. Сайфутдинов, Э.Р. Рахметова, А.Г. Мухаметшина, О.В. Шлямина, Э.И. Семенов, Казань. - 2020. – 16с.