

УДК 619:636.52/.58

Микотоксины в кормах: лабораторные методы обнаружения, обзор полученных результатов

Шевяков А.Н., заведующий лабораторией биохимического анализа, кандидат биологических наук

Гогина Н.Н., старший научный сотрудник отдела физиологии и биохимии

Круглова Л.М., младший научный сотрудник отдела физиологии и биохимии

Грозина А.А., ведущий научный сотрудник отдела физиологии и биохимии, кандидат биологических наук
ФГБНУ Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН (ФНЦ «ВНИТИП» РАН)

Аннотация:

Приведены данные мониторинговых исследований зерновых и зернобобовых компонентов кормов и готовых кормов, поступивших в лабораторию биохимии ФНЦ «ВНИТИП» РАН в период с 2010 по 2018 гг., на наличие в них микотоксинов. Исследования были проведены методами ИФА и ВЖХ. Среди микотоксинов наиболее распространенными в кормах и их ингредиентах были трихотецены и зеараленон. Среди ингредиентов кормов лидером по разнообразию и содержанию микотоксинов стали образцы кукурузы; в результате во всех готовых комбикормах с кукурузой обнаружено от 3 до 9 разных микотоксинов в разных концентрациях. В 98% всех изученных проб содержалось три или более микотоксинов. Сделан вывод, что ситуация с распространением микотоксинов в кормах в России достаточно серьезная, и контаминацию сырья микотоксинами обязательно нужно иметь в виду при составлении рецептур кормов для продуктивных видов животных. Это важно не только в плане профилактики микотоксикозов животных, но и с точки зрения безопасности получаемых от них пищевых продуктов.

Ключевые слова: микотоксины, мониторинг, иммуноферментный анализ (ИФА), жидкостная хромато-масс-спектрометрия.

Введение. Безопасность пищевых продуктов и кормов стала вызывать все большую озабоченность потребителей, государственных контролирующих органов и производителей сельскохозяйственной продукции в связи с развитием глобального рынка продуктов питания и кормов, производимых и распространяемых по всему миру, а также из-за повышения осведомленности общественности о влиянии питания на здоровье. Среди веществ, загрязняющих корма и продукты питания, важное место занимают природные ксенобиотики, такие

как микотоксины, вырабатываемые плесневыми грибами [1].

Микотоксины (от греч. *mykes* – гриб и *toxikon* – яд) – это вторичные метаболиты микроскопических грибов-плесеней, обладающие токсичными свойствами. Есть все основания полагать, что эти вторичные метаболиты могут выполнять многочисленные функции, направленные на обеспечение выживания микроскопических грибов и их конкурентоспособности в борьбе за место в различных экологических нишах [2].

Понятие «микотоксикозы» как группы незаразных болезней жи-

вотных, возникающих при поедании кормов, пораженных токсическими грибами, было введено советским и российским ученым в области ветеринарии Арутюном Христофоровичем Саркисовым. В 60-е годы XX в. он стал основоположником нового научного направления – учения о болезнях человека и животных, возникающих от токсино-образующих грибов [3].

В последние годы в мире обострилась проблема микотоксикозов животных, представляющая чрезвычайно высокую экономическую и экологическую опас-





КОРМЛЕНИЕ

ность для животноводства и здоровья человека. Известно, что от качества кормовой базы во многом зависит здоровье и продуктивность животных, а значит – доброкачественность продуктов питания человека [4].

Привлечь большее внимание к вопросу микотоксикозов ученым удалось благодаря развитию лабораторных методов обнаружения микотоксинов.

В настоящее время требования к анализу проб пищевых продуктов и кормов достаточно высоки. Эти требования связаны с использованием чувствительных, быстрых и точных аналитических методов для получения информации об уровнях микотоксинов в пищевых продуктах и кормах и для поддержки деятельности по установлению стандартов безопасности пищевых продуктов [1,5].

Эти требования, в сочетании с растущим разнообразием образцов, привели к развитию как быстрых скрининг-методов, прежде всего, на основе иммунохимических реакций, так и сложных мульти-аналитических подходов, например, основанных на жидкостной хроматографии в сочетании с многоступенчатой масс-спектрометрией для обнаружения и одновременного количественного определения широкого спектра микотоксинов [6].

Тем не менее, химическое разнообразие микотоксинов и широкий спектр анализируемых сельскохозяйственных товаров и продуктов питания существенно осложняют разработку методов

анализа микотоксинов. Кроме того, их концентрации в пищевых продуктах и кормах могут значительно варьировать [7].

Целью настоящей работы был обзор содержания микотоксинов в различных кормовых средствах, поступающих в лабораторию ФНЦ «ВНИТИП» РАН из хозяйств и предприятий средней полосы России.

Материал и методы исследований. Скрининг образцов зерновых и зернобобовых кормовых ингредиентов, а также комбикормов на содержание микотоксинов (Т-2 токсин, зеараленон, дезоксиниваленон, сумма афлатоксинов (АВ), фумонизин В1, охратоксин А) проводился методом иммуноферментного анализа (ИФА) в соответствии с ГОСТ 31653-2012 [8] с использованием анализатора иммуноферментных реакций StatFax 303+ и тест-систем AgraQuant® ELISA (Romer Labs, Австрия). Исследованные пробы кормовых средств поступали в лабораторию биохимии ФНЦ «ВНИТИП» РАН из разных регионов России, происхождение основной части их было неизвестным. На методику работы с тест-системами утвержден Стандарт Организации (СТО 97266118-001-2008) «Сырье и продукция растительного и животного происхождения. Корма. Иммуноферментный метод определения микотоксинов».

Для подтверждения результатов скрининга методом ИФА, а также для проведения рутинных испытаний на содержание микотоксинов в кормах, применялся метод

с использованием системы ВЖХ-МС/МС – тандемная жидкостная хромато-масс-спектрометрия (хроматограф Agilent Infinity LC Systems 1290 и масс-спектрометр AB SCIEX Triple Quad™ 5500). Список определяемых при помощи данного метода микотоксинов был расширен до тридцати одного: Т-2 токсин, НТ-2 токсин, зеараленон (ЗЕН), дезоксиниваленон (ДОН), дезоксиниваленон-3-гликозид, ниваленон, диацетоксисцирпенон, афлатоксин В1, афлатоксин G1, фумонизин В1 (ФУМ), фумонизин В2, фумонизин В3, охратоксин А (ОА) и др.

Метод, использованный для анализа, был оптимизирован и утвержден по регламенту ISO/IEC в соответствии с руководящими принципами, установленными Генеральным Директоратом по вопросам здравоохранения и защиты прав потребителей Европейской Комиссии (SANCO) в 2012 г., номер документа 12495/2011. Статистическая обработка данных выполнялась с использованием программы Excel 2010.

Результаты исследований. Методом ИФА в период с 2010 по 2018 гг. всего было исследовано 390 проб зерна, в том числе 172 – пшеницы, 113 – кукурузы, 70 – ячменя, 8 – овса, 19 – сои, 8 – гороха. Данные по содержанию микотоксинов в различных ингредиентах кормов представлены в табл. 1-4.

Более половины исследуемых проб пшеницы содержали Т-2 токсин, афлатоксины и охратоксин А (53,5; 67,0 и 51,75% проб соответственно). Однако общее

Таблица 1. Результаты исследований пшеницы в 2010-2018 гг.

Показатели	Микотоксины					
	Т-2	АВ	ОА	ЗЕН	ДОН	ФУМ
Количество проб:						
всего в анализе	172	148	143	142	153	14
«отрицательных»	80	49	69	119	89	12
«положительных»	92	99	74	23	64	2
выше ПДК	1	0	2	0	3	0
ниже ПКО	48	40	26	15	44	1
Доля проб, %						
«положительных»	53,5	67,0	51,75	16,2	41,83	14,29
выше ПДК	0,58	0,00	1,40	0,00	1,96	0,00
ниже ПКО	27,90	26,03	18,20	10,56	28,80	7,10
Содержание микотоксинов, мг/кг						
максимальное	0,15	0,013	0,068	0,27	3,7	0,26
среднее	0,043	0,005	0,013	0,077	0,6	0,26
ПДК, мг/кг	0,10	0,02	0,05	1	1	-

количество проб с превышением ПДК по микотоксинам было незначительным: по Т-2 токсину – 0,58%; охратоксину А – 1,4%, ДОН – 1,96%. Количество проб пшеницы, в которых были обнаружены «следовые количества» (ниже предела количественного обнаружения, ПКО) микотоксинов значительно колебалось: от 7,1% по фумонизину до 28,8% по ДОН. В большом количестве образцов пшеницы содержание микотоксинов было ниже уровня ПКО; в «следовых количествах» Т-2 токсин был обнаружен в 27,9%, афлатоксины – в 26,0%; охратоксин

А – в 18,2% и ДОН – в 28,8% испытанных проб. Примечательно, что в 2 из 12 исследуемых проб пшеницы при анализе методом ИФА был обнаружен фумонизин, характерный для этого вида корма.

В значительном количестве испытанных проб зерна кукурузы (табл. 2) были обнаружены ДОН (80,90% проб), Т-2 токсин (75,22%), фумонизин В1 (73,68%) и охратоксин А (45,56%); причем в значительном количестве образцов (38,05%) было отмечено превышение ПДК по Т-2 токсину. В значительной части испытанных

Таблица 2. Результаты исследований кукурузы в 2010-2018 гг.

Показатели	Микотоксины					
	Т-2	АВ	ОА	ЗЕН	ДОН	ФУМ
Количество проб:						
всего в анализе	113	90	90	87	89	76
«отрицательных»	28	59	49	63	17	20
«положительных»	85	31	41	24	72	56
выше ПДК	43	5	2	1	5	3
ниже ПКО	17	23	24	9	33	13
Доля проб, %:						
«положительных»	75,22	34,44	45,56	27,59	80,9	73,68
выше ПДК	38,05	5,56	2,22	1,15	5,62	3,95
ниже ПКО	15,04	25,6	26,7	10,3	37,07	17,1
Содержание микотоксинов, мг/кг:						
Максимальное	2,33	1,63	0,16	1,5	5,06	18,7
Среднее	0,39	0,42	0,017	0,21	0,7	2,4
ПДК, мг/кг	0,10	0,02	0,05	1	1	5

проб кукурузы афлатоксины, охратоксин А, ДОН и фумонизины были обнаружены в количествах ниже ПКО (25,6; 26,7; 37,07 и 17,1% соответственно).

Анализ зерна ячменя (табл. 3) показал, что почти в 73% исследуемых проб содержится Т-2 токсин, причем примерно в 15% проб его уровень был выше ПДК.

Фумонизин не был обнаружен ни в одной из 70 испытанных проб. Количество проб с содержанием других микотоксинов ниже ПКО колебалось от 14 до 47% (14,3% Т-2 токсин; 22,2% зеараленон; 29,0% охратоксин А; 41,9% ДОН; 46,6% афлатоксины).

Количество образцов овса, поступивших в лабораторию биохимического анализа на испытания в период 2010-2018 гг., было небольшим (8 проб); этого количества недостаточно для получения достоверных данных. Однако в 7 пробах был обнаружен Т-2 токсин и ДОН, в 4 пробах – охратоксин А, в 3 пробах – зеараленон. Обнаруженное максимальное содержание Т-2 токсина превышало ПДК почти в 2 раза, а четверть испытанных проб имели массовую долю по данному микотоксину выше ПДК.

Количество проб гороха было также небольшим (8 образцов). В испытанных образцах гороха были обнаружены: в 5 пробах – ДОН, в 4 пробах – Т-2 токсин, в 1 пробе – афлатоксин и охратоксин А. Зеараленон и фумонизин в образцах гороха отсутствовали. Почти треть образцов содержала Т-2 токсин (37,5%) и ДОН (28,5%) в количествах ниже уровня ПКО.





КОРМЛЕНИЕ

В период 2010-2018 гг. методом ИФА было исследовано 19 проб соевых бобов. Во всех образцах были обнаружены Т-2 токсин и ДОН. Афлатоксины присутствовали в 12 пробах, охратоксин А – в 7 пробах, а зеараленон – в 6 образцах сои. Хотя превышение ПДК было отмечено только в одной пробе по Т-2 токсину и ДОН, количество проб сои, содержащих афлатоксины и зеараленон в концентрациях ниже уровня ПКО, было значительным – 43,7 и 35,35% соответственно. Фумонизин, как и во всех образцах овса, ячменя и гороха, в сое также не был обнаружен.

В нашу лабораторию поступает на анализ достаточно много проб комбикормов. Но учитывая, что матрица комбикорма весьма сложна, результаты анализа методом ИФА требуют подтверждения методом ВЖХ, и поэтому мы приводим данные за три последних года. В этот период для анализа кормов использовался метод с применением оборудования высокоэффективной хроматографии в тандеме с масс-спектрометрией для подтверждения исследований методом ИФА.

В значительном количестве испытанных проб комбикормов для птицы были обнаружены Т-2 токсин (88,7%), ДОН (86,2%), афлатоксины (80%). Однако максимальные и средние значения концентрации микотоксинов были невысокими относительно их ПДК, принятых для зерна в Российской Федерации.

В результате исследований методом тандемной жидкостной

Таблица 3. Результаты исследований ячменя в 2010-2018 гг.

Показатели	Микотоксины					
	Т-2	АВ	ОА	ЗЕН	ДОН	ФУМ
Количество проб:						
всего в анализе	70	58	62	54	62	10
«отрицательных»	19	21	33	41	24	10
«положительных»	51	37	29	13	38	0
выше ПДК	10	0	2	0	1	0
ниже ПКО	10	27	18	12	26	0
Доля проб, %:						
«положительных»	72,9	63,8	46,8	24,1	61,3	0,0
выше ПДК	14,3	0,0	3,23	0,0	1,61	0,0
ниже ПКО	14,3	46,6	29	22,2	41,9	0,0
Содержание микотоксинов, мг/кг:						
максимальное	0,43	0,06	0,14	0,38	5,67	0,0
среднее	0,094	0,005	0,032	0,38	0,76	0,0
ПДК, мг/кг	0,1	0,02	0,05	1	1	-

хромато-масс-спектрометрии в ингредиентах кормов (зерновые, зернобобовые, жмыхи и шроты) и комбикормах были обнаружены трихотеценовые микотоксины типа А: НТ-2 токсин в 79%, Т-2 токсин в 76%, диацетоксисцирпенол – в 4% образцов; трихотеценовые микотоксины типа В: дезоксиниваленол в 70%, ниваленол в 24%, дезоксиниваленол-3-гликозид в 22% образцов. Также в кормах были выделены охратоксин А (51% образцов), фумонизин В1 (37%), фумонизин В2 (19%) и фумонизин В3 (15% образцов). Значительная часть кормов была

заражена зеараленоном (69% образцов). Афлатоксины В1 и G1 были выявлены только в следовых количествах в 4% образцов.

Среди ингредиентов кормов лидером по разнообразию и содержанию микотоксинов стали образцы кукурузы. Наибольшая концентрация Т-2 токсина составила 424 мкг/кг, НТ-2 токсина – 689 мкг/кг, фумонизина В1 – 6821 мкг/кг, фумонизина В2 – 1808 мкг/кг, фумонизина В3 – 681 мкг/кг, зеараленона – 277 мкг/кг.

Соответственно комбикорма, содержащие в своем составе ку-

Таблица 4. Результаты исследований комбикормов для птицы в 2015-2018 гг.

Показатели	Микотоксины					
	Т-2	АВ	ОА	ЗЕН	ДОН	ФУМ
Количество проб:						
всего в анализе	71	65	65	61	65	61
«отрицательных»	8	13	16	33	9	49
«положительных»	63	52	49	28	56	12
выше ПДК	0	0	0	0	1	0
ниже ПКО	13	2	2	0	9	3
Доля проб, %:						
«положительных»	88,7	80	75,4	45,9	86,2	19,7
выше ПДК	0,0	0,0	0,0	0,0	1,54	0,0
ниже ПКО	18,3	3,1	3,1	0,0	13,8	4,9
Содержание микотоксинов, мг/кг:						
максимальное	0,1	0,017	0,035	0,18	1,11	1,14
среднее	0,05	0,006	0,007	0,048	0,393	0,442
ПДК, мг/кг	0,1	0,02	0,05	1	1	5

курузу, в той или иной степени были насыщены микотоксинами от трех до девяти видов. Содержание трихотеценовых микотоксинов типа В в значительных количествах было установлено в образцах пшеницы. Так, наибольший результат по дезоксиниваленолу составил 1940 мкг/кг, и практически все образцы содержали ниваленол. Наибольшая концентрация зеараленона в пшенице составляла 220 мкг/кг.

Но самое высокое содержание дезоксиниваленола было выявлено в ячмене и составляло 8985 мкг/кг. Это количество содержалось только в одном образце, все остальные отличались относительно высоким благополучием по содержанию микотоксинов.

Почти все образцы (98%), поступившие на анализ в лабораторию ФНЦ «ВНИТИП» РАН, содержали в себе три или более видов микотоксинов. Концентрация токсинов варьировала от следовых до весьма значительных относитель-

но ПДК, принятых в Российской Федерации.

Заключение. Мониторинговые исследования будут продолжены, но уже сейчас можно сказать, что ситуация с распространением микотоксинов в кормах, поступающих на исследование в лабораторию ФНЦ «ВНИТИП» РАН, достаточно серьезная, и контаминацию сырья микотоксинами обязательно нужно иметь в виду при составлении рецептур кормов для продуктивных видов животных. Это важно не только в плане профилактики микотоксикозов животных, но и с точки зрения безопасности получаемых от них пищевых продуктов.

Литература

1. Krska R., Schuhmacher R. Mycotoxin analysis. Guide to mycotoxins // World Nutrition Forum 2012: The Proc. – Vienna, Austria, 2012. – P. 119-139.
2. Котик А.Н. Микотоксикозы птиц. - Борки, 1999. - 267с.
3. Саркисов А.Х. Избранные труды. Ми-

кология. Микотоксикозы. Дерматомикозы. - М., 2000. - 414 с.

4. Вертипрахов В.Г., Гогина Н.Н., Грозина А.А., Хасанова Л.В., Ребракова Т.М. Пищеварение и обмен веществ у мясных кур при экспериментальном микотоксикозе // Ветеринария и кормление. - №6 – 2017.
5. The Mycotoxin Blue Book.-Diaz D.E., Ed. – Nottingham Univ. Press, 2005.–349 pp.
6. Попов В. Каким ПДК верить? // Аграрное обозрение. -2014. - №2. - С. 46-50.
7. Шамрай С.М. Микотоксины – постоянная угроза со стороны «экологически чистых» природных ядов // Биология: все для учителя. - 2010. - №1. - С. 7-14.
8. ГОСТ 31653-2012. Корма. Метод иммуноферментного определения микотоксинов. - Введ. 2013-07-01. – М.: Стандартинформ, 2012. – 11 с.

Для контакта с авторами:

Гогина Надежда Николаевна

E-mail: n.n.gogina@mail.ru

Шевяков Александр Николаевич

E-mail: alex.shevy@mail.ru

Грозина Алена Андреевна

E-mail: alena_fisinina@mail.ru

Mycotoxins in Feeds: Lab Detection Methods and Their Results

Shevyakov A.N., Gogina N.N., Kruglova L.M., Grozina A.A.

Dept. of Physiology & Biochemistry, Federal Scientific Center
“All-Russian Research and Technological Poultry Institute” of Russian Academy of Sciences

Summary: The data of the monitoring of mycotoxin contamination of the samples of different feed ingredients and compound feeds entered the Institute’s Laboratory of Biochemistry in 2010-2018 are presented. The ELISA methods of detection were later coupled with combined HPLC and mass spectrometry technique. The most abundant mycotoxins in Russian feedstuffs and feeds were trichotecenes and zearalenone. Corn was the most contaminated ingredient of standard compound feeds for poultry; all corn-based feeds contained from 3 to 9 different mycotoxins in different concentrations. 98% of all samples analyzed contained 3 or more mycotoxins. The conclusion is made that the situation with mycotoxin contamination of feed ingredients and feeds in Russia is presently quite serious and that this contamination should be taken into account when formulating the diets for productive animals and poultry. It is important for the prevention of mycotoxicoses in animals and poultry and for the safety of animal-derived foodstuffs.

Key words: mycotoxins, monitoring, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), high performance liquid chromatography – mass spectrometry (HPLC-MS).

