

КОНТРОЛЬ БЕЗПЕЧНОСТІ РОСЛИННОЇ ПРОДУКЦІЇ ЗА ВМІСТОМ МІКОТОКСИНІВ

Наведено результати досліджень з визначення вмісту мікотоксинів в кукурудзі та пшениці озимій імуноферментним методом аналізу. Проведено аналіз наявності афлатоксину В1, охратоксину А, ДОН та фумонізину скринінговою імунобіосенсорною технологією на основі поверхневого плазмонного резонансу.

мікотоксини, контамінація, зерно, ІФА, біосенсор

Особливо небезпечними забруднювачами продуктів харчування та кормової сировини є продукти життєдіяльності пліснявих грибів — мікотоксини. Мікотоксини продукуються грибами родів *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichothecium* [3]. Серед значного різноманіття токсинів [4] найбільш поширеними та небезпечними є афлатоксин В1, охратоксин А, фуманізін, дезоксиніваленон (ДОН), зеараленон та ін. Забруднення продукції рослинництва мікотоксинами створює постійну і серйозну небезпеку для здоров'я людини та призводить до значних економічних втрат в аграрній сфері України.

Деякі чинники контамінації зернової сировини мікотоксинами можна контролювати, це — система обробітку ґрунту (ступінь ураження рослинних залишків), спосіб і організація збирання врожаю, дотримання правил зберігання продукції. Однак висока температура та вологість при вирощуванні і зберіганні є каталізатором розвитку та поширення токсиноутворюючих грибів [5]. Мікотоксини зеараленон, фумонізін, ДОН можуть накопичуватися в зерні як у полі, так і під час зберігання [6]. Афлатоксин В1 та охратоксин А зазвичай уражують зерно під час його зберігання, хоча трапляються випадки зараження ще на стадії росту рослини.

Через можливість контамінації продукції рослинного походження на всіх етапах вирощування, переробки, транспортування та зберіган-

Н.Ф. ШПИРКА¹,
молодший науковий співробітник

О.С. ПАВЛОВ¹,
кандидат сільськогосподарських наук

В.А. МАЛІЄНКО²,
кандидат сільськогосподарських наук

К.Є. ШАВАНОВА¹,
кандидат біологічних наук

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ;
²ТОВ «Вектор-Бест-Україна», м. Київ

ня [1, 2] варто контролювати рівень мікотоксинів у зерновій продукції не лише після збору врожаю, а й проводити моніторинг посівів під час вирощування. Основним чинником збереження високої якості продукції є своєчасне виявлення та ідентифікація мікотоксинів, встановлення їх концентрації та прийняття рішень щодо подальших заходів з усунення проблеми.

Кількість мікотоксинів, що підлягають контролю в Україні, є дещо меншою, ніж в країнах ЄС, а гранично допустимі концентрації (ГДК) деяких можуть суттєво варіювати. Наприклад, вміст охратоксину А в кукурудзі, пшениці та ячменю в Україні не регламентується, а згідно з європейськими нормами Регламент Комісії ЄС № 1881/2006 зазначає допустиму норму на рівні 0,005 мг/кг.

Загальноприйняті нині методи виявлення мікотоксинів — тонкошарова хроматографія (ТШХ), високоефективна рідинна хроматографія з флуоресцентним детектуванням (ВЕРХ) [7], рідинна мас-спектрометрія (LS-MS) [8], імуноферментний аналіз (ІФА) [9] — потребують стаціонарного дорогоцінного лабораторного обладнання. Це ускладнює їх залучення до оперативного контролю і моніторингу. Тому потрібна розробка альтернативного скринінгового методу визначення мікотоксинів, наприклад,

з використанням імунобіосенсорної технології на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР) для експрес діагностики [10—12].

Метою роботи був моніторинг вмісту мікотоксинів у рослинній продукції методом ІФА та дослідження можливості використання імунобіосенсорного аналізу для визначення низки мікотоксинів.

Матеріали та методи. Експериментальні дослідження з контролю вмісту мікотоксинів проводили впродовж 2014—2016 рр. у ВП НУ-БіП України «Агрономічна дослідна станція», с. Пшеничне Васильківського району Київської області, та в господарствах Полтавської області. Кормову сировину для моніторингу відбирали в період збирання та зберігання. Зразки середніх проб відбирали відповідно до діючих державних стандартів (ГОСТ 13586.3 — 2015, ДСТУ 3355) [18, 19].

Для визначення впливу кліматичних чинників на утворення токсигенних штамів грибів у мікрофлорі зерна використовували гідротермічний коефіцієнт (ГТК) [13].

Для проведення досліджень методом ІФА використовували тест-системи Redascreen (виробництво R-Biopharm, Німеччина) [14—16].

Імунобіосенсорний аналіз здійснювали на оптичному сенсорі «Плазмонтест» — біосенсорі на основі ППР, розробленому в Інституті кібернетики ім. Глушкова НАН України (патент UA 100934) [20]. Екстракцію проводили з урахуванням попередніх досліджень та аналізу даних з літературних джерел [17].

Використовували антитіла до мікотоксинів ДОН, афлатоксину В1, фумонізину та охратоксину А (ОТА) виробництва Sigma (США).

Результати досліджень. Чинники вологості і температури повітря відіграють важливу роль у розвитку патогенних грибів впродовж вегетації. Тому було проведено оцінку типовості погодних умов вегетаційного сезону за даними метеослужби ВП НУБіП України «Агрономічна

дослідна станція» та визначено гідротермічний коефіцієнт за період з квітня по жовтень (рис. 1).

Гідротермічний коефіцієнт в умовах вегетації 2014 р. становив 2,7, в умовах 2015 — 1,5, 2016 р. — 2,0. Проте помісячні показники ГТК різко відрізнялися і часто свідчили про екстремальність умов. Мінливість погодних умов за окремі місяці 2015 року проявлялася істотним підвищенням суми активних температур у серпні і вересні (K_i — 1,5 та 1,1 відповідно); 2016 року — у квітні (K_i — 1,7). За показниками зволоження екстремально зволуженим виявився травень 2014 року (K_i — 2,3), та істотно зволуженими — квітень-травень 2016 року (K_i — 1,9 та 1,2 відповідно) (рис. 1).

Таким чином, метеорологічні показники в період вегетації 2014—2016 рр. значною мірою відрізнялись від багаторічних показників та сприяли розвитку токсинотворюючих грибів.

Небезпека мікотоксикозів полягає не лише в швидкому накопиченні мікотоксинів, а й в тому, що слід вчасно виявляти ураження, ще до початку видимих ознак контамінації (рис. 2).

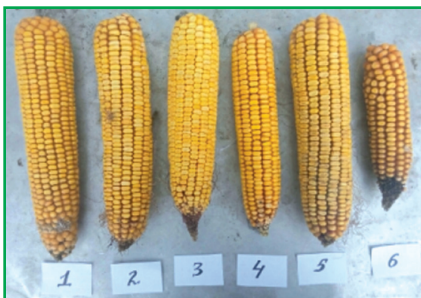


Рис. 2. Початковий прояв ураження качанів кукурудзи пліснявими грибами

Зразки для аналізу були відібрані під час збирання і зберігання кукурудзи та пшениці, як основних потенційних мішеней ураження мікотоксинами, та були протестовані методом ІФА (табл. 1).

Проведений моніторинг свідчить, що зараження пшениці і кукурудзи відбулося мікотоксинами ДОН, фумонізін, афлатоксин В1 і охратоксин. Частота виявлення ДОН була найвищою серед інших мікотоксинів, найвищий рівень становив 1,179 мг/кг. Фумонізін посідав друге місце за ступенем ураження і максимальна його концентрація 2016 року становила 0,293 мг/кг.

Забрудненість кормів афлаток-

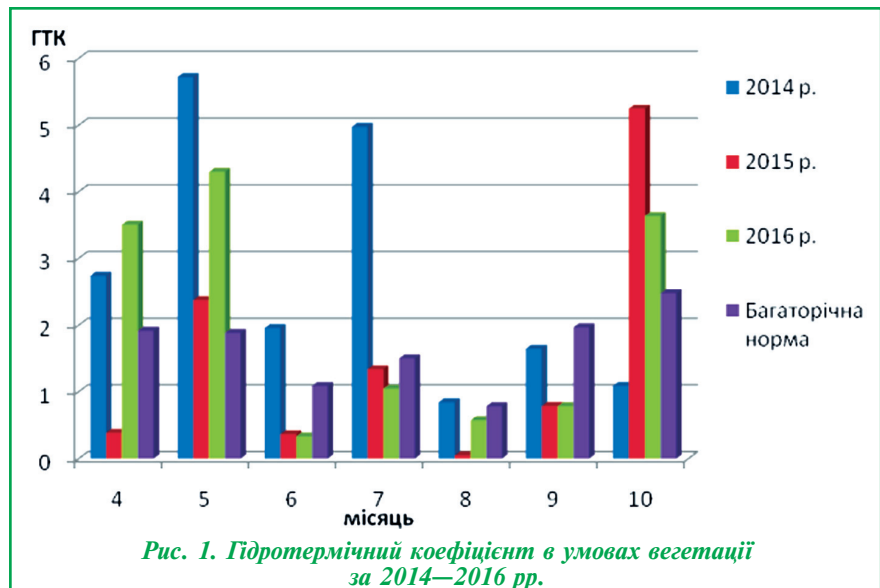


Рис. 1. Гідротермічний коефіцієнт в умовах вегетації за 2014–2016 рр.

сином В1 і охратоксином А зустрічалася рідше, порівняно з іншими мікотоксинами, і переважно серед зразків, що мали біте, ушкоджене насіння, та під час тривалого зберігання.

Відомо, що надлишок опадів під час дозрівання, порушення термінів збирання, механічне пошкодження

врожаю сприяють накопиченню мікотоксикогенних грибів *Penicillium* і *Aspergillus* в кормах, що значно збільшує вірогідність їх ураження мікотоксинами. Тому нами проведено аналіз зерна кукурудзи на вміст охратоксину А та афлатоксину В1 за різних термінів зберігання (табл. 2).

Таким чином, за тривалого збе-

1. Середні значення вмісту мікотоксинів у відібраних зразках

Регіон відбору проб	Рік відбору	Вміст токсинів, мг/кг			
		ОТА	Афлатоксин В1	ДОН	Фумонізін
ВП НУБІП України «Агрономічна дослідна станція», Київська обл.	Кукурудза				
	2014	0,0024	—*	0,0206	0,0673
	2015	—*	—*	0,0294	0,0559
Полтавська обл.	2016	0,0033	0,003	0,0476	—*
	2014	0,0024	—*	0,0381	0,0743
	2015	—*	0,004	0,0592	—*
ВП НУБІП України «Агрономічна дослідна станція», Київська обл.	Пшениця				
	2016	—*	—*	0,179	0,13
	2014	—*	0,0045	0,0398	0,061
Полтавська обл.	2015	—*	—*	0,125	—*
	2016	0,003	—*	0,537	0,293
	2014	—*	0,0031	1,0284	0,057
Полтавська обл.	2015	—*	—*	1,304	0,0591
	2016	0,0017	0,0049	0,0502	0,0478

Примітка: * — менше межі виявлення

2. Визначення вмісту мікотоксинів в зерні кукурудзи за різних термінів зберігання

Час проведення аналізу	Вміст токсинів, мг/кг	
	Охратоксин А	Афлатоксин В1
Збирання врожаю	—*	—*
Зберігання 60 діб	0,0048	—*
Зберігання 90 діб	0,0097	0,0067

Примітка: * — менше межі виявлення

рігання спостерігається тенденція до збільшення рівня вмісту «комірних» мікотоксинів. Відсоток контамінації зерна кукурудзи охратоксином А після 60-добового зберігання становив 33,3%, а після 90 днів — 47%. Вміст афлатоксину В1 в зерні після 90 днів зберігання урожаю зустрічався лише в 20% зразків.

Після ідентифікації мікотоксинів методом ІФА зразки було протестовано на вміст афлатоксину В1, охратоксину А, фумонізіну та ДОН за допомогою імунобіосенсора на основі ППР.

Для підвищення чутливості визначення біосенсора та скорочення терміну аналізу було проведено попередню підготовку його трансдюсера. Поліелектролітна плівка на золотій поверхні формувалась з використанням розчину ПААГ. Поліелектроліт використовували в концентрації 1 мг/мл. Час експозиції розчину становив 15 хвилин. Потім на поверхню, вкрити плівкою поліелектроліту, наносили розчин білка А концентрацією 20 мкг/мл з подальшою інкубацією впродовж 15 хв. Після нанесення білка А здійснювали адсорбцію розчину антитіла (At) відповідних мікотоксинів протягом 20 хв.

Наступним етапом було нанесення розчину бичачого сироваткового альбуміну (БСА) в концентрації 20 мкг/мл протягом 15 хв для блокування можливих вільних місць на золотій поверхні. Концентрація БСА була підібрана з урахуванням зміни величини резонансного кута, до моменту, поки значних зсувів не спостерігалось (це означає, що на поверхні практично не залишилось вільних місць зв'язування, а концентрація антитіла достатня для створення максимально щільного шару).

Особливо важливим етапом для одержання достовірних результатів є процедура очищення екстрактів від коекстрактивних речовин, що можуть знижувати чутливість аналізу та призвести до неселективного сигналу датчика. З урахуванням цих вимог та задля спрощення процедури екстрагування було підібрано концентрацію розчинника метанолу (65% водного розчину), вміст якого в досліджуваному зразку не впливав на результат. При виявленні мікотоксину ДОН розчинник не використовували, лише розводили зразок у фізичному розчині (ФР). У всіх зразках зберігали співвідношення

маси з розчинником 1:4, ретельно перемішували та давали відстоятися. Надсадковий шар відфільтровували та вносили в комірку біосенсора, контролюючи рН на рівні 7,4.

Аналізуючи зразок з високою концентрацією мікотоксину, виявленим ІФА, його розводили, з урахуванням концентрації специфічного антитіла даного мікотоксину, з подальшим перерахунком концентрацій.

Із введенням у вимірювальну комірку екстракту зразка величина відгуку біосенсора суттєво збільшувалася, що свідчило про специфічну реакцію на утворення комплексу Ag-At.

Із сукупної кількості 20-ти проаналізованих зразків з відомим вмістом досліджуваних мікотоксинів 19 було підтверджено імунобіосенсорним аналізом. Лише 1 зразок з ураженням зерном кукурудзи охратоксином А не дав суттєвого зсуву величини резонансного кута. Причиною могла бути залишкова кількість мікотоксину та надмірний контакт зразка зі світлом. Серед 6-ти зразків, що не були визначені як контаміновані ІФА методом, у двох було визначено афлатоксин В1 і в одному — фуманізін, що свідчить про дещо вищу чутливість імунобіосенсорного аналізу порівняно з традиційним методом ІФА.

ВИСНОВКИ

Головним завданням сучасного контролю безпечності кормової продукції є пошуки можливості вчасного виявлення, визначення та попередження ураження мікотоксинами. Вчасне контролювання поширення пліснявих грибів ще на стадії вирощування рослинної продукції в поєднанні всіх агротехнічних аспектів зменшить ризики ураження кормової сировини мікотоксинами, що дасть змогу одержати якісний та безпечний урожай.

Результати досліджень 318 зразків зерна пшениці та кукурудзи, проведених за період з 2014 р. по 2016 р. імуноферментним методом, вказують на значну ураженість мікотоксинами кормової продукції, та на необхідність систематичного контролю сировини. Було показано можливість виявлення та ідентифікації мікотоксинів імуносенсорним аналізом з вибірковою тестуванням проб, уражених афлатоксином, охратоксином А, ДОН та фумонізином.

ЛІТЕРАТУРА

1. J.W. Bennett, M. Klich *Mycotoxins Clin. Microbiol. Rev.*, 16 (2003), pp. 497—516.
2. Kokkonen, M.; Ojala, L.; Parikka, P.; Jestoi, M. *Mycotoxin production of selected fusarium species at different culture conditions. Int. J. Food Microbiol.* 2010, no.143, pp.17—25.
3. Тутельян В.А. *Микотоксини / В.А. Тутельян, Л.В. Кравченко. — АМН СССР. — М.: Медицина, 1985. — 211 с.*
4. Cole, R.J., and R. H. Cox. *Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press, New York, N.Y.*, 1981.
5. H.S. Hussein, J.M. Brasel *Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals Toxicology*, 2001, no.167, pp. 101—134.
6. Монастирський О.А. *Токсинуотворюючі гриби та мікотоксини / О.А. Монастирський // Захист і карантин рослин. — 2006. — № 11. — С. 18—20.*
7. Y. Li, Y. Zhang, W. Shi et al. *Determination of deoxynivalenol in cereals by immunoaffinity clean-up and ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry // Methods Chromat.*, 2012, no.56(2), pp. 192—197.
8. Saeger De Sarah, Hans P. van Edmond *Special issue: masked mycotoxins // J. World Mycotox.*, 2012, no. 5(3), pp. 203—206.
9. Y. Li, Y. Zhang, W. Shi et al. *Determination of T-2 toxin in milk: a comparison of three formats of immunoassays // Analytical. Letters.*, 2012, no. 45, pp. 2425—2435.
10. Dorokhin, D.; Haasnoot, W.; Franssen, M.C.R.; Zuilhof, H.; Nielen, M.W.F. *Imaging surface plasmon resonance for multiplex microassay sensing of mycotoxins. Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, no. 400, pp. 3005—3011.
11. Kadota, T.; Takezawa, Y.; Hirano, S.; Tajima, O.; Maragos, C.M.; Nakajima, T.; Tanaka, T.; Kamata, Y.; Sugita-Konishi, Y. *Rapid detection of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using surface plasmon resonance immunoassay. Anal. Chim. Acta*, 2010, no.673, pp. 173—178.
12. *Біосенсори в сільському господарстві / К.Є. Шаванова, Н.Ф. Шпирка, М.В. Таран, М.Ф. Стародуб // Актуальні проблеми наук про життя та природокористування: III Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених, 28—31 жовтня 2015 р.: тези допов. — Київ, 2015. — С. 50.*
13. Селянинов Г.Т. *Мировой агроклиматический справочник / Г.Т. Селянинов. — М. — Л.: АН СССР, 1937. — 132 с.*
14. *Методичні вказівки по кількісному визначенню дезоксиніваленолу у зразках злаків, солоду, кормів, пива і сула тест-системою Рідаскрин ДОН (Ridascreen DON) виробництва фірми Р-Біофарм (R-Biopharm), Німеччина. — 2004. — Затверджено ДДВМ України № 115, 07.10.2004. — 8 с.*
15. *Методичні вказівки по кількісному визначенню загального афлатоксину у зерні, продуктах його переробки та комбікормах тест-системою Рідаскрин Афлатоксин Загальний (Ridascreen Aflatoxin Total) виробництва фірми Р-Біофарм (R-Biopharm), Німеччина. — 2004. — Затверджено ДДВМ України № 115, 07.10.2004. — 8 с.*
16. <http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/mycotoxins>
17. Franz Berthiller, Colin Crews, Chiara Dall'Asta et al. *Masked mycotoxins: A review Mol Nutr Food Res.* 2013 Jan; 57(1): 165—186. *Published online, 2012 Oct 10. doi: 10.1002/mnfr.201100764*
18. *Продукція сільськогосподарська рослинна. Методи відбору проб в процесі*

карантинного огляду та експертизи: ДСТУ 3355-96 — [Чинний від 01-07-1997] — Київ : Держспоживстандарт України. — 62 с. — (Національні стандарти України).

19. *Зерно*. Правила приемки и методы отбора проб: ГОСТ 13586.3-83 — [Чинний від 01-09-1990] — М.: Изд.-во стандартов, 1990. — 20 с.

20. Пат. України № 100934 «Пристрій для дослідження біологічних речовин та об'єктів» / В.О. Багацький, І.Д. Войтович, С.С. Курлов, та ін. ; власник Інститут кібернетики ім. В.М. Глушкова. НАН України Пром. власність, бюл. № 2, 25.01.2013.

Шпирка Н.Ф., Павлов А.С., Малиенко В.А., Шаванова Е.Е.

Контроль безопасности растительной продукции на содержание микотоксинов

Приведены результаты исследований по определению содержания микотоксинов в кукурузе и пшенице озимой иммуноферментным методом анализа. Проведен анализ наличия афлатоксина, охратоксина А, ДОН и фумонизинов скрининговой иммунобиосенсорной технологией на основе поверхностного плазмонного резонанса микотоксины, контаминация, зерно, ИФА, биосенсор

Shpyrka N., Pavlov O., Malienko V., Shavanova E.

Control of the safety of plant products for the content of mycotoxins

The proposed article represents results of ELISA analysis of mycotoxins content in corn and winter wheat. The analysis of the presence of aflatoxin B1, ochratoxin A, fumonisin and DON by screening biosensor technology based on surface plasmon resonance.

mycotoxins, insertion, grain, ELISA, biosensor

Рецензент:

Ковалишина Г.М., доктор сільськогосподарських наук, професор НУБіП України



ПАМ'ЯТАЄМО!

З 1964 р. працював молодшим науковим співробітником, з 1965 р. — виконуючим обов'язки завідувача відділу фітопатології.

Визначивши новий напрям досліджень — імунітет рослин до хвороб, у 1966 р. заснував лабораторію імунітету сільськогосподарських рослин до хвороб, якою керував впродовж 45-ти років. За результатами численних наукових досліджень підготував та захистив докторську дисертацію. З 1986 по 2003 р. Михайло Павлович був директором Інституту, а з 2011 р. працював головним науковим співробітником заснованої ним лабораторії.

Основними напрямками наукових досліджень М.П. Лісового були розробка теоретичних та методологічних основ імунітету рослин; вивчення генетичних і фізіологічних чинників імунітету для обґрунтування принципів і методів селекції на стійкість; вивчення структури вірулентності популяцій збудників хвороб рослин; ідентифікація генів вірулентності збудників хвороб; ідентифікація генів стійкості рослин; теоретичне обґрунтування створення сортів сільськогосподарських культур із груповою стійкістю проти шкідливих організмів з використанням методів клітинної біології. Практичні розробки: методи створення комплексних штучних інфекційних фонів; експрес-методи оцінки і добору форм рослин із груповою стійкістю проти збудників хвороб; методика ізоляції генів стійкості пшениці проти збудників бурої іржі та борошнистої роси; створено банки генів стійкості; виведено в співавторстві сорти і гібриди огірка (Сквирський 1/27 F₁), соняшнику (Кий) і пшениці озимої (Деметра, Економка, Миронівська

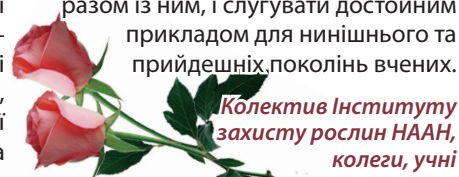
сторічна, МІП Дніпрянка), що характеризуються груповою стійкістю проти збудників хвороб. Михайло Павлович по праву може вважатись продовжувачем наукової справи М.І. Вавилова, Т.Д. Страхова, В.Ф. Пересипкіна та інших відомих вчених.

Наукові надбання М.П. Лісового — це понад 300 наукових праць, із яких 30 у зарубіжних журналах, 5 монографій, підручник для аграрних вищих навчальних закладів, 7 методичних вказівок, 11 авторських свідоцтв.

Багато зусиль Михайло Павлович прикладав у справу підготовки й закріплення наукових кадрів. Він був членом спеціалізованих вчених рад при Інституті захисту рослин НААН та Національному університеті біоресурсів і природокористування України. Створив наукову школу імунологів в Україні, підготувавши 30 кандидатів та 5 докторів наук.

Брав активну участь у роботі Європейської і Середземноморської організації по іржі хлібних злаків, Міжнародної організації з біологічного захисту рослин. Був головою НМЦ «Захист рослин», членом редколегій п'яти наукових журналів. Все це сприяло й сприяє підвищенню авторитету та ролі науки в сучасному суспільстві, успішному вирішенню глобальних продовольчих, екологічних та соціальних проблем.

Світлий образ Михайла Павловича Лісового буде завжди жити в пам'яті тих, хто його знав та працював разом із ним, і слугувати достойним прикладом для нинішнього та майбутніх поколінь вчених.



Коллектив Інституту захисту рослин НААН, колеги, учні

28 травня 2017 р. на 83-му році пішов із життя **Лісовий Михайло Павлович** — відомий вчений у галузі фітопатології, генетики, імунології, захисту рослин та екології, доктор біологічних наук, професор, академік Національної академії аграрних наук України, іноземний член Російської та Польської академії наук, лауреат Державної премії в галузі науки і техніки, Заслужений діяч науки і техніки України.

Отримавши 1959 року вищу освіту за фахом вченого агронома та пропрацювавши завідувачем фітопатологічної ділянки в учбовому господарстві Української сільськогосподарської академії «Митниця», Михайло Павлович із 1961 р. свою трудову та наукову діяльність пов'язав з Інститутом захисту рослин НААН. Тут він пройшов наукову підготовку в аспірантурі, результатом чого став успішний захист кандидатської дисертації.