

МИКОЛОГИЯ

УДК 632.4:582.288.45

К. М. Григорян, академик А. Л. Осипян, О. Юссеф

Микобиота сухого зерна кукурузы в Армении и ее токсигенность

(Представлено 22/VII 2009)

Ключевые слова: плесневые грибы, микотоксины, зеараленон, дезоксиниваленон, зерно кукурузы

Кукуруза является одной из основных пищевых и кормовых зерновых культур. При созревании и хранении семена кукурузы чаще других зерновых культур загрязняются плесневыми грибами и микотоксинами. Обзор научной литературы и накопленный нами опыт по фитопатологическому и микотоксикологическому анализу хранящегося сухого зерна кукурузы позволяет характеризовать этот продукт как благоприятную среду для развития плесневых грибов и продуцирования микотоксинов, опасных для здоровья человека и животных.

Состав микобиоты и степень ее токсичности на видовом и штаммовом уровне зависят от сочетания многих факторов, что и диктует необходимость региональных исследований.

Среди выявленных грибов доминирующими по числу видов являются роды *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* [1].

Выделяемые с зерна кукурузы виды известны как продуценты микотоксинов — фумонизинов, зеараленона, афлатоксинов и др. По данным Пелеагрии [2], наиболее характерным и специфичным для сухого зерна кукурузы является вид *F. moniliforme*, обладающий способностью продуцировать зеараленон (ЗОН), фумонизины, монилиформин и другие токсические метаболиты.

С присутствием фумонизина В₁ ряд авторов связывает нарастающий риск возникновения раковых заболеваний у населения, употребляющего зерно с высоким содержанием этого токсина [3-5]. Исследования зерновых,

в основном кукурузы, импортированных из стран Юго-Восточной Азии, выявили фумонизины в 50% образцов. В 48% случаев они присутствовали совместно с афлатоксинами [6-8].

Интенсивность образования и химический спектр микотоксинов зависят от многих факторов — почвено-климатических, условий хранения урожая, транспортировки и др. Токсигенность гриба резко возрастает при переходе с диких видов на культурные сорта сельскохозяйственных растений [9].

Возможность развития грибов и накопления микотоксинов не только в период вегетации кукурузы, но и в период хранения зерна делают актуальным вопрос изучения распространенности токсигенных грибов в различных регионах Армении.

В связи с этим проведено микотоксикологическое исследование, целью которого явилось выявление состава микобиоты, поражающей сухое зерно кукурузы из различных климато-географических районов Армении, установление токсичности штаммов мицелиальных грибов-контаминантов и пораженных сухих семян кукурузы, а также способности токсигенных грибов продуцировать следующие микотоксины: афлатоксин В₁, дезоксиниваленол (ДОН) и ЗОН.

Материал и методы. Исследовано 37 образцов зерна местной кукурузы в период хранения.

Отбор проб и подготовку зерна для анализа на загрязненность микромицетами и микотоксинами проводили в соответствии с ISO 7698 [10]. Для выявления грибов-контаминантов использовали методы серийных разведений, влажных камер, а также непосредственный посев зерна на питательные среды: Чапек-агар, глюкозо-дрожжевой агар с хлорамфениколом [11]. Количество спор мицелиальных грибов в 1 г зерна определяли по ISO 76954 [10].

Чистые культуры грибов, выделенные из зерна кукурузы, идентифицировали до вида, используя известные руководства. Частоту встречаемости микромицетов определяли согласно Мирчинк [12].

Токсигенную активность штаммов и суммарного экстракта штаммов *F. moniliforme* и *F. culmorum*, а также суммарного экстракта из кукурузы определяли биотестированием [13]. Для этого грибы инкубировали на модифицированной жидкой среде Чапека-Докса. По истечении 20 суток инкубирования проводили экстракцию токсических метаболитов смесью ацетонитрил-вода (3:1). Биотестирование и хроматографический анализ грибных экстрактов на наличие микотоксинов проводили согласно [13,14].

Результаты и обсуждение. Микологическим анализом выявлено 33 вида и вариаций грибов-контаминантов из двух классов и 7 родов. Из класса

Zygomycetes обнаружен лишь вид *Rhizopus nigricans*. Остальные 32 вида относятся к митоспоровым грибам из класса *Hyphomycetes*. В их числе 11 видов относятся к роду *Penicillium*, 8 — *Aspergillus*, 9 — *Fusarium*, 2 — *Alternaria*, а *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Stemphylium* представлены по одному виду. Их развитие отмечается вскоре после сбора урожая на початках в виде обильного плесневого налета, нередко принимающего мозаичную окраску, обусловленную развитием комплекса грибов разной родовой и видовой принадлежности.

В последние годы в Армении наблюдается массовая колонизация початков кукурузы микромицетами из рода *Fusarium*. Изучение состава микобиоты зерна кукурузы показало, что оно практически повсеместно поражается видами *F. moniliforme*, *F. moniliforme* v. *minus*, *F. moniliforme* v. *subglutinans* и *F. culmorum*, которые потенциально могут контаминировать зерно микотоксинами.

Как явствует из табл. 1, контаминирующая зерно кукурузы микобиота представлена 8 доминантными видами, в основном из рода *Fusarium*, и 13 видами, для которых характерна редкая частота встречаемости. Редкая частота встречаемости характерна для 11 видов преимущественно из родов *Alternaria*, *Penicillium* и *Aspergillus*. К видам с умеренной частотой встречаемости относятся *Aspergillus ochraceus*, *A. flavus*, *A. niger*, *P. viridicatum*, *Cl. herbarum*, *F. sambucinum*, *Al. circinanas* и др.

Проведенные исследования показали, что среди 9 видов рода *Fusarium*, входящих в состав грибного сообщества на зерне кукурузы, доминирующее положение занимают виды *F. moniliforme*, *F. culmorum*, *F. proliferatum*, *F. sambucinum*. Особого внимания заслуживают политоксичный вид *F. moniliforme*, а также второй по значимости как компонент микоценозов *F. culmorum*, также обуславливающий контаминацию зерна ЗОН.

Результаты, представленные в табл. 2, показывают, что высокая степень заспоренности микромицетами, в пределах от 2×10^5 до 6×10^5 кое/г, наблюдается в образцах кукурузы из Иджеванского, Вайкского, Армавирского марзов. В исследованных образцах наблюдалось доминирование видов *F. moniliforme*, *C. herbarum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *R. nigricans*. Из рода *Penicillium* на кукурузе из Армавирского марза наиболее часто встречается вид *P. atramentosum*. В образцах кукурузы из Вайка типично частыми являются виды *F. culmorum*, *F. poae*. Кукуруза из Гегаркуникского марза в подавляющем большинстве случаев контаминирована видами *P. viridicatum*, *P. crustosum*.

Видовой состав грибов, выделенных из сухого зерна кукурузы

Класс грибов	Род гриба	Вид гриба	Частота встречаемости, %
Zygomycetes	Rhizopus	R. nigricans Ehrenb.	70.0
Hyphomycetes	Aspergillus	A. candidus Link	11.0
		A. clavatus Desm.	12.0
		A. flavus Link	34.0
		A. foetidus K.(Nakm.) Thom	13.0
		A. fumigatus Fresen.	37.0
		A. niger Tiegh.	40.0
		A. ochraceus Wilhelm	30.0
		A. terreus Thom	25.0
	Penicillium	P. atramentosum Thom	62.0
		P. camemberti Thom	9.0
		P. crustosum Thom	22.0
		P. cyclopium Westling.	11.0
		P. hordei Stolk	15.0
		P. nalgiovense Laxa	8.0
		P. puberulum Bainier	15.0
		P. roqueforti Thom v. punctatum S.Abe	10.0
		P. viridicatum Westing.	28.0
		P. velutinum Y.F.H Beyma	11.0
		P. oxalicum Currie et Thom	5.4
	Alternaria	A. circinans Balle	8.1
		A. matthiolae Neerg.	5.4
	Cladosporium	C. herbarum(Pers.ex Schleich.) Link	52.0
	Stemphylium	S. ilicis Tengwall	10.8
	Fusarium	F. avenaceum (Fr.) Sacc.	45.0
		F. culmorum(W. Simall) Sacc.	80.0
		F. moniliforme I. Sheldon	85.0
		F. moniliforme v. minus Wr.	65.0
		F. moniliforme v. subglutinans Wheld et Rg.	55.0
		F. poae (Peck) Wollenw.	32.4
		F. proliferatum (Wollenw.) Raillo	65.0
		F. sambucinum Fuckel	45.9
		F. solani (Mart) Appel.et Wollenw.	21.6

Примечание. 2.7-14% — редкая частота встречаемости; 14-51.4% — умеренная частота встречаемости;

>51.4% — высокая частота встречаемости, согласно Элькади и др.[11].

Проведен микотоксикологический анализ 20 образцов зерна кукурузы на присутствие микотоксинов — афлатоксина В₁, ДОН и ЗОН (табл. 3). В 8 образцах, т.е. в 40% образцов кукурузы, выявлен ЗОН в количестве от 1 до 8 мг/кг. Афлатоксин В₁ и ДОН в исследуемых образцах не обнаружены.

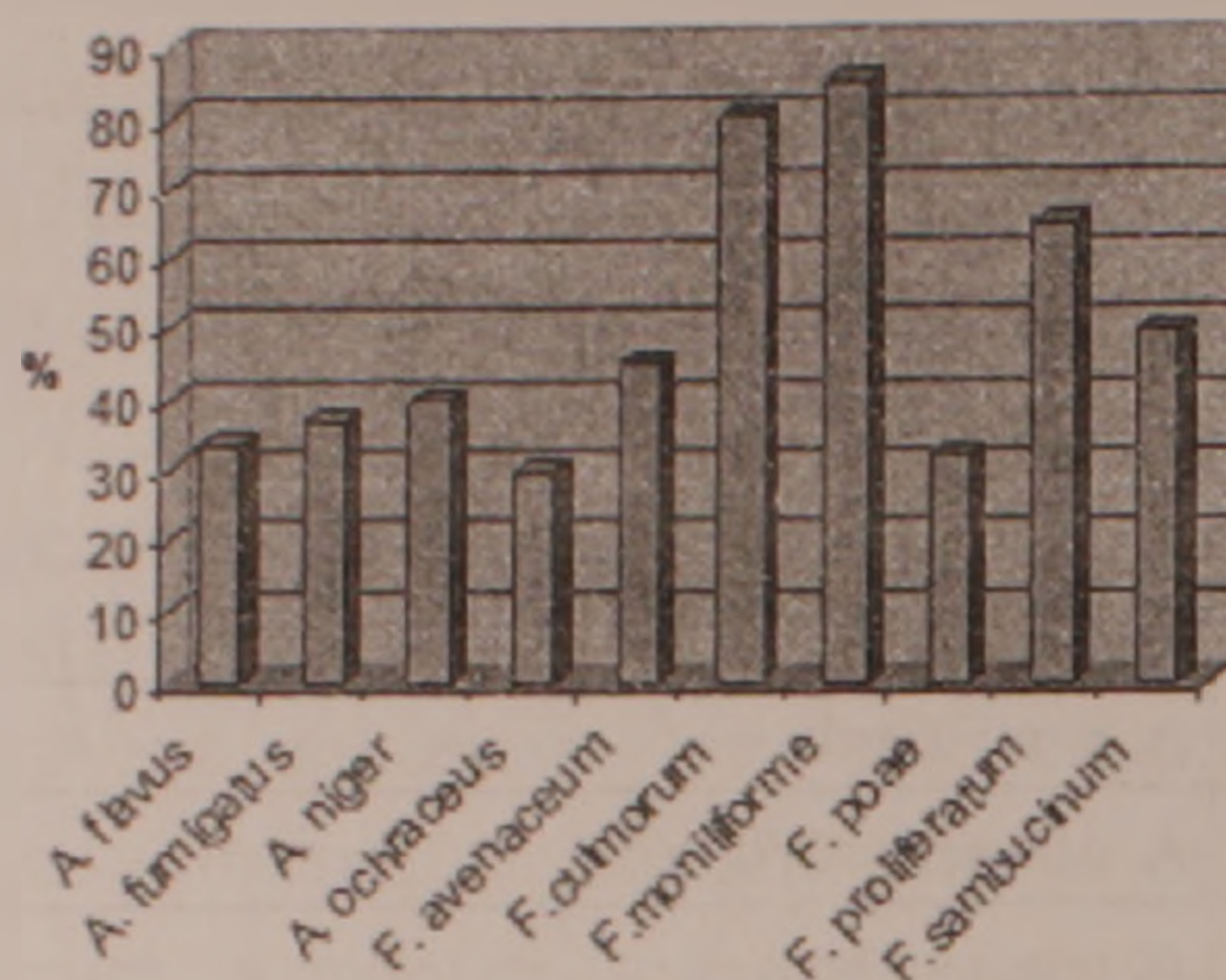


Рис. 1. Доминирующие виды из родов *Fusarium* и *Aspergillus* — контаминанты зерна кукурузы.

Таблица 2

Степень заспоренности образцов зерна кукурузы грибными контаминантами по марзам возделывания культуры в Армении

Доминирующие ассоциации	Марз	Степень заспоренности образцов, кое/г
<i>Fusarium moniliforme</i>	Котайкский	5×10^4
<i>F. moniliforme</i> v. <i>minus</i> , <i>F. proliferatum</i>	Котайкский	6×10^4
<i>F. moniliforme</i> , <i>F. moniliforme</i> v. <i>subglutinans</i> ,	Ширакский	5×10^4
<i>Penicillium viridicatum</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i>	Гегаркуникский	3×10^4
<i>P. crustosum</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>F. avenaceum</i>	Гегаркуникский	5×10^4
<i>F. moniliforme</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> <i>F. moniliforme</i> v. <i>sublateritium</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Alternaria circinans</i>	Иджеванский	2×10^5
<i>F. culmorum</i> , <i>F. poae</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Rhizopus nigricans</i>	Вайкский	3×10^5
<i>F. culmorum</i> , <i>R. nigricans</i> , <i>P. atramentosum</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>A. ochraceus</i>	Армавирский	6×10^5
<i>F. moniliforme</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. niger</i> , <i>R. nigricans</i> , <i>P. Atramentosum</i>	Армавирский	6×10^5

Таблица 3

Результаты анализа экстрактов сухого зерна кукурузы, отобранной из различных районов Армении, на токсичность и содержание микотоксинов.

Образцы кукурузы по марзам	Содержание микотоксинов, мг/кг			Токсичность зерновых экстрактов биотестированием	
	ДОН	Афлатоксин В1	ЗОН	Artemia salina	Paramecium caudatum
Котайкский	-	-	1.0	+	+
Котайкский	-	-	5.0	+++	+++
Ширакский	-	-	3.1	++	++
Иджеванский	-	-	6.0	+++	+++
Вайкский	-	-	1.5	+	++
Армавирский	-	-	5.5	++	+++
Армавирский	-	-	8.0	+++	+++
Севанский	-	-	4.2	++	+++

Примечание. - – токсины не обнаружены; + – слабая токсичность, ++ – умеренная токичность , +++ – острая токсичность по [5; 13].

Таблица 4

Токсинообразующая способность штаммов грибов, контаминирующих сухое зерно кукурузы

F. moniliforme, штамм	Степень токсичности, % гибели личинок A.salina	Микотоксины, мкг/л	
		ДОН	ЗОН
K-36	+++ (70)	-	3500
K-32	+++ (90)	-	5000
K-26	++ (52)	-	1500
K-22	++ (55)	-	1200
K-30	+(35)	-	500
K-28	++ (57)	-	-
F. culmorum			
K-55	++ (50)	-	2700
K-50	++ (47)	-	1200
K-62	++ (56)	-	1500
K-66	-(9)	-	-
K-1015	+++ (85)	-	8000

Одновременно проводилось биотестирование суммарного экстракта зерна кукурузы на личинках *Artemia salina* и *Paramecium caudatum* с целью выявления степени токсичности зерна по областям произрастания растения. Результаты проведенных исследований представлены в табл. 3.

Степень токсичности кукурузы находится в прямой зависимости от количественного содержания ЗОН в экстрактах. Высокая степень токсичности обнаружена у пяти образцов кукурузы с повышенной степенью заспоренности видами *F. moniliforme* и *F. moniliforme* v. *minus*, *F. culmorum*.

Проведен токсикологический анализ 11 штаммов грибов-контаминантов, относящихся к видам *F. moniliforme* и *F. culmorum* (табл.4). Все исследованные штаммы проявили токсичность, но в разной степени. Из 6 проанализированных штаммов *F. moniliforme* 5 вызвали гибель более 50% взятых для эксперимента личинок *Artemia salina*, из 5 штаммов *F. culmorum* — 3 штамма.

Все испытанные штаммы, за исключением двух (*F. moniliforme* К-28 и *F. culmorum* К-66), оказались продуцентами ЗОН. Максимальное количество зеараленона — более чем 8000 мкг/л жидкой питательной среды было обнаружено в экстракте, полученном из штамма *F. culmorum* К-1015.

Высокая частота встречаемости грибов, поражающих сухое зерно кукурузы, результаты по определению токсигенного потенциала и возможности продуцирования микотоксина зеараленона отдельными штаммами рода *Fusarium*, свидетельствуют об актуальности для Армении проблемы загрязнения кормовой и пищевой кукурузы токсигенными грибами. В связи с этим микотоксикологический контроль в республике должен быть усилен с целью предотвращения острых и хронических интоксикаций и микотоксикозов, которые могут быть вызваны у человека и сельскохозяйственных животных при употреблении контаминированного зерна кукурузы и продуктов его переработки.

Ереванский государственный университет

К. М. Григорян, академик Л. Л. Осипян, О. Юссеф

Микобиота сухого зерна кукурузы в Армении и ее токсигенность

Исследовано 37 образцов зерна местной кукурузы в период хранения. Выделено и идентифицировано 33 вида и вариаций грибов-контаминантов из двух классов и 7 родов. Среди 9 видов рода *Fusarium*, входящих в состав грибного сообщества на зерне кукурузы, доминирующее положение занимают виды *F. moniliforme*, *F. culmorum*, *F. proliferatum*, *F. sambucinum*. В 40% образцов кукурузы выявлен зеараленон

в количестве от 1 до 8 мг/кг. Афлатоксин В₁ и ДОН в исследуемых образцах не обнаружены.

Կ. Մ. Գրիգորյան, ակադեմիկոս L. L. Օսիպյան, Օ. Յուսեֆ

Նայաստանի եգիպտացորենի չոր հատիկների միկոբիոտան եւ նրա տոքսիգենությունը

Ուսումնասիրվել է տեղական եգիպտացորենի հատիկների 37 նմուշ՝ պահպանման ընթացքում: Անջատվել եւ նույնականացվել են աղտոտիչ սնկերի 33 տեսակներ եւ վարիացիաներ, որոնք պատկանում են 2 դասի եւ 7 ցեղի: Հեղազոտությունները ցույց տվեցին, որ եգիպտացորենի հատիկներն աղտոտող սնկերի համակեցության կազմի մեջ մտնող *Fusarium* ցեղի 9 տեսակներից դոմինանտ են հանդիսացել *F. moniliforme*, *F. culmorum*, *F. proliferatum*, *F. sambucinum* տեսակները: Նմուշների 40%-ում հայտնաբերվել է զեառալենոն 1-8 մգ/կգ քանակներով: Հեղազոտվող նմուշներում աֆլատոքսին В₁ եւ դեզօքսինիվալենոն չեն հայտնաբերվել:

K. M. Grigoryan, academician L. L. Osipyan, O. Yussef

Mycoflora of Dried Grain of Corn in Armenia and its Toxigenity

37 samples of local grain corn are investigated during the storage period. 33 species and variations of contaminant fungi from two classes and 7 genera are isolated and identified. Among 9 species of *Fusarium* genera which are a part of fungal association on corn grain, *F. moniliforme*, *F. culmorum*, *F. proliferatum*, *F. sambucinum* species are dominants. ZON is revealed in 40% of samples of corn in quantity of 1-8 mg/kg. Aflatoxin B₁ and DON were not found in the investigated samples.

Литература

1. Munoz L., Cardelle M., Pereiro M., Requera R. - J.Agr.Food Chem. 1990. V.38. N4. P.1004-1006.
2. Pellegrini D., Laurent Boccas B., Koheler F., Sauviam M., Platzer N. - Microbiol., Alim. Nutr. 1990. V. 8. (3). P. 249-256.
3. Nicacio M. S., Prado G., Linard V.R. - Agr.Biol.e Technol. 1995. V. 38. N3. P. 851-857.
4. Missmer S.A., Suarez L., Felkner M., Wang E., Merrill A.H., Jr., Rothman K.J., Hendricks K.A. - Environ. Health Perspect. 2006. V. 114. 237 p.
5. Marasas W.F.O., Shefard G.S., Sydenham E.W. - 1993. 93 ICC Int. Symp. Cereal Sci. and Technol. Impact Chang Africa. Pretoria. 1993. 9-13 May. P.58.

6. *Riley R.T., K.A. Voss* - Fumonisin: Mechanism of Mycotoxicity *Rev.med. (Fr)*. 1998. V. 146. P. 617-626.
7. *Bakan B., Melcion D., Richard-Molard D., Cahagnier B.* - *J. Agric. Food Chem.* 2002. V. 50 (4). P. 728-731.
8. *Zang H.* - *Rept. Nat. Food Res Inst.* 1998. V. 62. P.16.
9. *Монастырский О.А.* В сб.: Современ.проблемы микол. и фитопатол. МГУ. 1998. С.79-80.
10. NF ISO 7698-91; NF ISO 7954-88 Cereales, legumineuses et produits derives - Denombrement des bacteries, levures et moisissures. AFNOR. Paris. 1991. P. 330. 1988. P. 131.
11. Методы экспериментальной микологии (справочник), п/ред. Билай В.И. Киев. Наукова думка. 1982. 547 с.
12. *Мирчинк Т.Г.* Почвенная микология. Изд. МГУ. 1988. 220 с.
13. *D.M.Watson, D.G.Lindsay* - *J. Sci. Food. Agr.* 1982. V. 33. P. 59-67.
14. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов. М. "Брандес"- Медицина. 1998. 338 с.
15. *El-Kady I.A., Abdel-Hafez J.N., El-Maraghy S.S.* - *Mycopathologia.* 1982. N77. P. 103-109.