

Выводы

1. В краткосрочных полевых опытах, состоящих из вариантов, примерно одинаково реагирующих на изменение погодных условий, оценка достоверности разности средних, определенная методами обобщенной НСР и обобщенной ошибки опыта, а также по максимальному годовому значению НСР и по результатам обработки данных сводного дисперсионного комплекса методом дисперсионного анализа и разностным методом по t-критерию Стьюдента дает одинаковый или близкий результат.
2. В краткосрочных полевых опытах, в состав которых входят варианты, существенно различающиеся по реакции на погодные условия, оценка достоверности различий между вариантами, проведенная путем попарного сравнения данных сводного дисперсионного комплекса по t-критерию Стьюдента, более корректна, чем оценка по другим методам.

Литература

1. Доспехов, Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – Изд. 4-е, перераб. и доп. / Б. А. Доспехов. – М.: Колос, 1979. – 416 с.
2. Константинов, П. Н. Основы сельскохозяйственного опытного дела / П. Н. Константинов. – М.: Сельхозгиз, 1952. – 446 с.
3. Молостов, А. С. Методика полевого опыта / А. С. Молостов. – М.: Колос, 1966. – 239 с.

4. Перегудов, В. Н. Методические указания по статистической обработке урожайных данных государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур / В. Н. Перегудов. – М.: Колос, 1968. – 76 с.
5. Уишарт, Дж. Основы методики полевого опыта / Дж. Уишарт, Г. Сандерс. – М.: Иностран. лит.-ра, 1958. – 206 с.
6. Короневский, В. И. К методике статистической обработки данных многолетних полевых опытов / В. И. Короневский // Земледелие. – 1985. – № 11. – С. 56–57.
7. Томилов, В. П. О статистической обработке многолетних данных полевых опытов / В. П. Томилов // Земледелие. – 1987. – № 3. – С. 48–51.
8. Афанасьев, Р. А. К методике дисперсионного анализа результатов многолетних полевых опытов / Р. А. Афанасьев // Агрехимия. – 2004. – № 5. – С. 85–91.
9. Жданович, В. П. О проблемах оценки достоверности изучаемых факторов в среднем за ряд лет / В. П. Жданович // Земляробства і ахова раслін. – 2012. – № 2. – С. 5–9. 10.
10. Ваулин, А. В. Определение достоверности средних многолетних показателей краткосрочных полевых опытов при обработке результатов исследований методом дисперсионного анализа / А. В. Ваулин // Агрехимия. – 1998. – № 12. – С. 71–75.
11. Фрид, А. С. К вопросу об ошибке средних многолетних показателей полевых опытов / А. С. Фрид // Агрехимия. – 2001. – № 5. – С. 76–80.
12. Исайкин, И. И. О совершенствовании элементов дисперсионного анализа многолетних данных полевого многофакторного опыта / И. И. Исайкин // Вестн. РАСХН. – 2000. – № 6. – С. 42–43.
13. Дзямбіцкі, М. Ф. Асаблівасці дысперсійнага аналізу вынікаў шматгадовага палявога доследу / М. Ф. Дзямбіцкі // Вест. Акад. аграр. навук Беларусі. – 1994. – № 3. – С. 60–64.

УДК 632.4.488

Использование разных методов для идентификации токсикогенных грибов в зерне кукурузы

С. В. Абраскова, Е. Л. Долгова, кандидаты с.-х. наук,
Н. М. Дубовик, младший научный сотрудник
НПЦ НАН Беларуси по земледелию

(Дата поступления статьи в редакцию 08.10.2018 г.)

На основе использования полимеразной цепной реакции и количественных методов высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии, иммуноферментного анализа выявлено, что образцы влажного консервированного зерна кукурузы содержали 2 вида грибов рода *Fusarium*, а также комплекс микотоксинов, в т. ч. дезоксиниваленол (1,7–1,8 мг/кг). Преимущество метода ПЦР заключается в точности, кратких сроках определения, и его следует рекомендовать для диагностики в зерне кукурузы наиболее распространенных в Беларуси токсикогенных грибов и продуктов их обмена.

Введение

Недочеты в процессе заготовки и хранения кормов вызывают не только значительные потери питательных веществ, но снижение их безопасности для сельскохозяйственных животных. По оценкам ученых, продуктивность и здоровье животных на 60–70 % зависят от количества и качества потребляемых кормов. Количество случаев контаминации кормов токсикогенными метаболитами и их продуцентами увеличилось. Данные анализа результатов пятилетних исследований (2011–2015 гг.) ЦНИЛхлебопродукт и Научно-практического центра НАН Беларуси по животноводству свидетельствуют о том, что из выборки (2162 образцов)

Based on polymerase chain reaction and quantitative methods of highly perfective liquid chromatography-mass spectrometry and immunoenzyme analysis, it was determined that samples of wet preserved corn grain contained 2 types of *Fusarium* fungi, as well as set of mycotoxins, including deoxynivalenol (1,7–1,8 mg/kg). The advantage of the PCR method consists in the accuracy and short terms, and it should be recommended for determining the most common toxicogenic fungi and ectocrines in corn grain in Belarus.

зерна и продуктов его переработки в одной трети из них (31,36 %) обнаружился один из шести определяемых в Республике Беларусь микотоксинов (афлатоксин В₁, охратоксин А, Т-2 токсин, дезоксиниваленол (ДОН), фумонизин В₁, зеараленон) [1, 2]. Самым часто встречающимся микотоксином в образцах зерна был ДОН. В кукурузе он обнаружился более чем в половине определяемых образцов: установлено превышение ПДК более чем в 2 раза в 9,2 % случаев. Т-2 токсин регистрировался в зерне кукурузы при частоте 22,1 % – до 0,1032 мг/кг при ПДК не более 0,1 мг/кг [3]. По афлатоксину, зеараленону, фумонизину превышение ПДК не установлено.

Наибольшую опасность по сравнению с другими известными микотоксинами представляют собой вторичные метаболиты, продуцируемые грибами рода *Fusarium* [4, 5, 6]. Широкое распространение и усиление вредности этих грибов – результат сочетания многочисленных факторов климатического и агротехнического характера. В настоящее время идентифицированы многие токсины грибов рода *Fusarium*. Так, *F. graminearum* и *F. culmorum* образуют ДОН, а также зеараленон, ниваленон; *F. sporotrichioides* – Т-2 токсин, *F. avenacium* – фумонизин и т. д.

В практике токсичность кормов обнаруживается с большим опозданием, когда имеются явные признаки отравления. Поэтому необходимы своевременная диагностика токсикогенных грибов и проведение мероприятий по предотвращению их развития в кормах. Использование микробиологического метода определения качественного состава микотоксинов в кормах на основании установления повышенного уровня обсемененности спорами или определенного рода плесневыми грибами недостаточно по причине, что при наличии микотоксинов их продуценты могут не обнаруживаться [6, 7]. Кроме того, еще одним недостатком микробиологического метода является длительность идентификации патогенов. Подавляющее большинство лабораторий, проводящих диагностику, в качестве основного метода используют иммуноферментный анализ (ИФА), но постепенно на смену ему приходит более чувствительный метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Повышенная чувствительность и возможность в некоторых модификациях ПЦР проводить количественную оценку присутствия фитопатогена делает этот метод более предпочтительным при диагностике.

Целью данной работы было исследование модифицированного нами метода полимеразной цепной реакции для экспресс-идентификации наиболее распространенных в Беларуси токсикогенных грибов рода *Fusarium* в зерне кукурузы.

Методы проведения исследований

Объектом исследований служило зерно кукурузы, выращиваемое на экспериментальном поле НПЦ НАН

Беларуси по земледелию. Все варианты силосованного влажного зерна кукурузы хранились в разных условиях: герметичных (0 дней экспозиции) и разгерметизированных (7–14 дней при доступе воздуха) с добавлением консервирующих препаратов.

Диагностику фитопатогенов и количественную оценку присутствия продуктов их обмена (микотоксинов) в зерне кукурузы осуществляли с помощью использования высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС), иммуноферментного анализа (ИФА, набор ИБОХ НАН Беларуси) и модифицированного метода полимеразной цепной реакции (ПЦР, набор ООО «Агродиагностика»). Молекулярно-генетическое выделение ДНК и проведение полимеразной цепной реакции проводили в режиме детекции Real-Time.

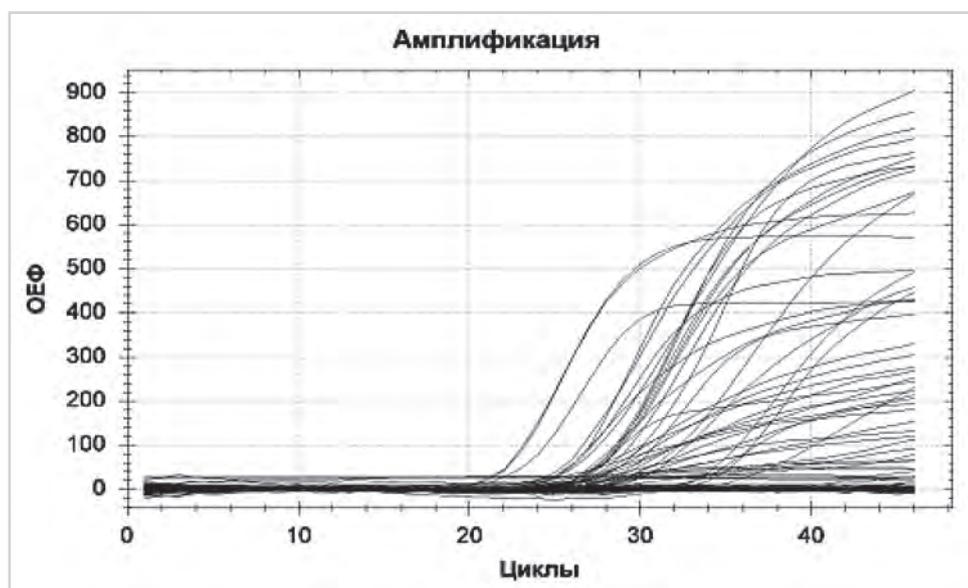
Результаты исследований и их обсуждение

Из результатов полимеразной цепной реакции следовало, что образцы консервированного зерна кукурузы содержали 2 вида грибов рода *Fusarium*.

Таблица 1 и рисунок демонстрируют и расшифровывают данные, полученные в результате полимеразной цепной реакции («+» – успешный отжиг праймера и проведение реакции; «-» – отжиг праймера не произошел).

Получены разные результаты по качественному составу грибов в зависимости от условий хранения влажного зерна и использования изучаемых консервирующих добавок. Так, в контрольном варианте без добавок комплекс токсинов обнаруживался как в анаэробных условиях хранения (0 экспозиции на воздухе), так и разгерметизированных условиях (при доступе воздуха в течение 1–2 недель), тогда как их продуценты *F. culmorum* и *F. avenacium* появлялись в динамике в нарастающем количестве в присутствии кислорода. Использование консервирующих добавок приводило к торможению роста изучаемых грибов, о чем свидетельствует отрицательный результат ПЦР анализа. Исключением составила мочевиная, которая не оказывала влияния на *F. avenacium*.

Количественная оценка присутствия продуктов их обмена (микотоксинов) в зерне кукурузы с помо-



Результаты амплификации

щью ИФА метода и высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) подтверждали полученные результаты ПЦР метода. Так, содержание микотоксина ДОН (*F. culmorum*) в контрольном варианте (без добавок) находилось на уровне 1,7–1,8 мг/кг, что превышало ПДК <1,0 мг/кг (таблица 2). Предварительно было установлено его значительное количество в исходном зерне, которое составляло 1,16 мг/кг. Остальные изученные микоток-

сины – Т-2 токсин, зеараленон, фумонизин, афлатоксин, охратоксин были в следовых количествах.

Содержание определяемых микотоксинов находилось практически на одном уровне в герметичных условиях и при доступе воздуха. Наши исследования свидетельствуют о том, что микотоксины, образованные грибами рода *Fusarium* в период вегетации растения или сразу после уборки урожая и попавшие в корм, сохраняли свою активность в течение длительного

Таблица 1 – Данные ПЦР консервированного зерна в разных условиях хранения

№ п/п	Вариант	Результаты ПЦР			
		<i>F. culmorum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. avenacium</i>	комплекс токсинов
1	Контроль* (без добавок)	–	–	–	+
2	–//– (7 дней)	+	–	–	+
3	–//– (14 дней)	++	–	+	+
4	Биопрепарат № 1*	–	–	–	+
5	–//– (14 дней)	–	–	–	+
6	Биопрепарат № 2*	–	–	–	+
7	–//– (14 дней)	–	–	–	+
8	Мочевина*	–	–	+	–
9	–//– (14 дней)	–	–	++	+
10	Биопрепарат № 1 + мочевины*	–	–	–	+
11	–//– (14 дней)	++	–	–	+
12	Биопрепарат № 2 + мочевины*	–	–	–	+
13	–//– (14 дней)	–	–	–	+
14	Антисептическая композиция*	–	–	–	+

Примечание – *Экспозиция 0 дней с изучением консервированного зерна сразу после вскрытия.

Таблица 2 – Содержание микотоксинов в консервированном (без добавок) зерне кукурузы в разных условиях хранения

Микотоксин	Метод определения (набор)	Содержание*, мг/кг		
		время экспозиции на воздухе, дней		ПДК**
		0	14	
Афлатоксин В ₁	ИФА-АФЛАТОКСИН, ИБОХ НАН Беларуси	<0,002	<0,002	0,02
Зеараленон	ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН, ИБОХ НАН Беларуси	0,164	0,100	≤1,0
Охратоксин А	ИФА-ОХРАТОКСИН А, ИБОХ НАН Беларуси	<0,005	<0,005	0,05
Дезоксиниваленол (ДОН)	ИФА-ДЕЗОСКИНИВАЛЕНОЛ, ИБОХ НАН Беларуси	1,7	1,8	≤ 1,0
Т-2 токсин	ИФА-ТОКСИН Т-2, ИБОХ НАН Беларуси	0,043	0,033	0,1
Фумонизин В ₁	ИФА-ФУМОНИЗИН, ИБОХ НАН Беларуси	<0,2	<0,2	5,0

Примечание – *Приведены средние значения двух результатов анализа;

**ПДК «Зерновые корма. Ветеринарно-санитарные правила обеспечения безопасности кормов, кормовых добавок и сырья для производства комбикормов».

Таблица 3 – Содержание микотоксинов во влажном зерне кукурузы с добавлением и без внесения препаратов, мг/кг (метод ВЭЖХ-МС/МС)

Микотоксин	ПДК	Вариант							
		контроль	биопрепарат 1	биопрепарат 2	мочевина	биопрепарат 1 + мочевины	биопрепарат 2 + мочевины	антисептическая композиция	антисептическая композиция
Дезоксиниваленол	≤1,0	1,6	0,870	0,707	1,1	0,705	0,772	0,879	1,1
Т-2 токсин	0,1	<0,003	<0,003	0,003	0,005	<0,003	0,003	<0,003	<0,003
Фумонизины:	5,0								
фумонизины В ₁		0,026	0,053	0,047	0,063	0,040	0,051	0,037	0,041
фумонизины В ₂		0,006	0,007	0,011	0,010	0,006	0,010	0,008	0,009
фумонизины В ₃		0,006	0,007	0,012	0,012	0,005	0,010	0,008	0,008
Афлатоксины:	0,02								
афлатоксин В ₁		не обнаружен							
афлатоксин G ₁		не обнаружен							
Охратоксин А	0,05	не обнаружен							
Зеараленон:	≤1,0	0,058	0,102	0,128	0,068	0,102	0,131	0,062	0,066
альфа-зеараленон		<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	0,003	<0,003
бета-зеараленон		0,006	0,011	0,007	0,005	0,005	0,006	0,004	0,008
НТ-2		0,132	0,140	0,138	0,213	0,085	0,199	0,105	0,087
Ниваленол		0,018	0,025	0,031	0,024	0,034	0,027	0,019	0,020

времени. При этом регистрировался комплекс токсинов, хотя их продуценты выявлялись в разгерметизированных условиях при наличии кислорода, т. е. более благоприятных для них. Полученные данные согласуются с результатами исследований других авторов, которые утверждают, что ДОН показывает большую стабильность, хотя во время силосования гибнет значительная часть спор грибов и происходит снижение активности микотоксинов под действием бактериальных и растительных ферментов [8, 9].

Количество ДОНа снижалось до уровня ниже нормативного (0,70–0,87 мг/кг) при внесении консервирующих добавок, за исключением мочевины (1,1 мг/кг) (таблица 3). Минимальное его количество было при совместном внесении биопрепарата + мочевины из расчета соответственно 1 л на 15 т и 3 кг/т силосуемой массы.

Заключение

В результате исследований было установлено, что метод полимеразной цепной реакции точен и позволяет определить вид патогена в кратчайшие сроки.

Диагностика фитопатогенов и количественная оценка присутствия продуктов их обмена (микотоксинов) в зерне кукурузы с помощью использования полимеразной цепной реакции и высокочувствительной жидкостной хромато-масс-спектрометрии показала, что исследуемые образцы зерна кукурузы содержали два вида фузариума – *F. culmorum*, *F. avenaceum*. Преимущество метода ПЦР заключается в точности, сроках определения, и его следует рекомендовать для проверки на содержание микотоксинов зерна кукурузы.

Сравнение антимикробной эффективности консервирующих препаратов показало, что все изучаемые добавки обладали фунгистатическим действием.

Литература

1. Микотоксины в зерне при производстве комбикормов / В. М. Голушко [и др.] // Наше сельское хозяйство. – 2016. – № 12. – С. 41–45.
2. Голушко, В. М. Микотоксины в комбикормах и комбикормовом сырье в Беларуси / В. М. Голушко, А. И. Козинец, И. И. Микульич // Наше сельское хозяйство. – 2016. – №6. – С. 51–55.
3. Ветеринарно-санитарные правила обеспечения безопасности кормов, кормовых добавок и сырья для производства комбикормов (в редакции постановления Минсельхозпрода Республики Беларусь от 20 мая 2011 № 33). – 43 с.
4. Ефанова, Л. И. Контаминированность микотоксинами кормов для крупного рогатого скота в хозяйствах Центрально-Черноземной зоны / Л. И. Ефанова // Достижение науки и техники АПК. – 2012. – № 1. – С. 25–27.
5. Жуленко, В. Н. Ветеринарная токсикология / В. Н. Жуленко, М. И. Рабинович, Г. А. Таланов. – М.: Колос, 2002. – 384 с.
6. Микотоксины и микотоксикозы / под ред. Д. Диаза. – М.: Печатный город, 2006. – С. 71–170.
7. Абраскова, С. В. Микробиологические аспекты обеспечения сохранности зерна кукурузы / С. В. Абраскова, Ю. К. Шашко, М. Н. Шашко, М. Н. Кадырова // Вестник науки. – 2017. – № 1. – С. 6–15.
8. Dänicke, S. Risikofaktoren für die Fusariumtoxinbildung in Futtermitteln und Vermeidungsstrategien bei der Futtermittelherstellung und Fütterung / S. Dänicke, E. Oldenburg // Landbauauforschung Völknerode (FAL), Sonderheft. – 2000. – S. 216.
9. Bauer, J. Pilzstoffwechselprodukte in Silagen: Einfluss auf die Gesundheit von Wiederkäuern / J. Bauer // VII Międzyn. Konf. Nauk. «Mikotoksyny i patogenne pleśnie w środowisku», Bydgoszcz., 2004. – P. 43–53.