

Миколого-токсикологическая характеристика консервированного влажного зерна кукурузы

Абраскова С.В., Шашко Ю.К., кандидаты с.-х. наук, доценты
Шашко М.Н., научный сотрудник
Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию (г. Жодино)
Вашкевич И.И., кандидат химических наук,
Свиридов О.В., доктор химических наук
Институт биоорганической химии НАН Беларуси (г. Минск)

Особенность зерна, как объекта хранения состоит в том, что содержит комплекс живых организмов, включая, бактерии, дрожжевые и плесневые грибы. Последние наиболее опасны, так как они могут заражать урожай еще до уборки (*Fusarium sp.*, *Alternaria sp.* и др.) или оказывают негативное воздействие на качественные показатели корма при несоблюдении условий его хранения (*Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Mucor sp.* и т.д.). Некоторые виды грибов рода *Fusarium* способны проявлять свойства, как паразитов, так и сапрофитов, что позволяет им развиваться также в послеуборочный период.

Основными факторами, обуславливающими аэробную порчу зерна, являются активное размножение дрожжевых грибов или высокое значение рН полученного корма. На первой стадии порчи происходит разогревание и увеличение рН, а на второй – плесневение. При этом единица роста показателя рН сопровождается увеличением количества плесени в корме в 10 раз [11]. Принято считать корм потенциально опасным, если плесневые грибы в нем становятся различимы визуально, их число возрастает до миллиона на 1 г корма (или 10^6 колониеобразующих единиц, КОЕ/г), безопасное количество грибов – около 10 тыс. (или 10^4 КОЕ/г) [12]. Из других источников следует, что площенное зерно кукурузы было нестабильным спустя две недели хранения зерна в условиях, допускающих контакт с воздухом при температуре $+4-8^\circ\text{C}$, хотя на момент вскрытия хранилища количество дрожжевых клеток и спор плесневых грибов составляло $8,3 \times 10^5$ на 1 грамм консервированного кукурузного зерна, которое возрастало затем до $6,1 \times 10^5$ КОЕ/г [7].

При интенсивном развитии грибов в корме может в значительной степени изменяться химический состав (количество жиров, затем углеводов и белков), снижаться переваримость корма, его энергетическая питательность, а в некоторых случаях он становится непригоден к скармливанию из-за образования микотоксинов. Сравнение питательной ценности непораженного кукурузного зерна и инфицированного плесневыми грибами варианта показало снижение содержания жира с 4% до 1,5%, сырого протеина – с 8,9% до 8,3% в сухом веществе [9]. В проведенных экспериментах Монастырского О.А., потери обменной энергии в партии пораженной кукурузы были на уровне 10% и белка до 5% [6]. Снижение концентрации энергии в 1 кг сухого вещества рациона только на 0,1 кормовую единицу приводит к уменьшению продуктивности сельскохозяйственных животных на 10% [4]. Одним из путей решения проблем, связанных с загрязнением микотоксинами кормов для сельскохозяйственных животных, является применение консервирующих препаратов при силосовании зерна кукурузы с учетом их избирательного действия в отношении возбудителей аэробной порчи и токсинообразующих грибов [1, 3, 7, 10].

Целью исследований было изучение токсико-микробиологических, биохимических показателей, питательности консервированного корма из зерна кукурузы повышенной влажности и усовершенствование способов обеспечения его сохранности и безопасности.

В качестве объекта исследования использовали влажное кукурузное зерно (33-40%), выращенное на опытном участке Научно-практического центра НАН Беларуси по земледелию в 2017-2018 гг. Уборку урожая проводили в сентябре-октябре, зерно размалывали на мельнице и консервировали без применения (контроль) и с применением различных добавок. Все изучаемые варианты консервированного зерна хранились герметично 1 и 3 месяца, затем при доступе воздуха 3, 7, 14 суток, температурном режиме $+4-8^\circ\text{C}$ (в холодильнике), $+22^\circ\text{C}$ (при комнатной температуре) и исследовались по органолептическим, биохимическим и миколого-токсикологическим показателям.

Идентификацию источников контаминации проводили с помощью микробиологического (чашечного) метода. Количественное определение микотоксинов осуществляли с применением наборов реагентов ИФА-АФЛАТОКСИН, ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН, ИФА-ОХРАТОКСИН А, ИФА-ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛ, ИФА-ТОКСИН Т-2, разработанных в Институте биоорганической химии НАН Беларуси. Используемый метод основан на принципе прямого конкурентного иммуноферментного анализа (далее-ИФА) и выполнялся в строгом соответствии с инструкциями по применению.

Микотоксины экстрагировали из анализируемых образцов водно-метанольным раствором, а дезоксиниваленол (ДОН) – водой. Подготовленные экстракты проб и градуировочные растворы с известной концентрацией микотоксина смешивались в отдельном планшете с раствором конъюгата и переносились в иммуносорбент. В лунках планшетного иммуносорбента конъюгаты микотоксинов с ферментом – пероксидазой – конкурируют с микотоксинами в составе градуировочных растворов или экстрактов анализируемых проб за связывание со специфическими антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. После промывки, в ходе которой удаляли не прореагировавшие с антителами компоненты, к системе добавляли хромоген-субстратный раствор, который позволяет визуализировать реакции микотоксин-антитело. Связанный с антителами конъюгат микотоксин-фермент превращал хромоген в окрашенный продукт, при этом интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации исследуемого микотоксина. Затем останавливали реакцию окрашивания добавлением стоп-реагента. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряли на микропланшетном фотометре как величину оптической плотности при длине волны 450 нм. По результатам измерений оптической плотности градуировочных растворов с известным содержанием микотоксина строили градуировочную зави-

симость, с помощью которой определяли массовую концентрацию микотоксина в анализируемых образцах.

Химический состав (протеин, жир, клетчатка, зола) зерна определяли общепринятыми методами, питательность (обменная энергия) – расчетным путем.

Учет степени загрязнения зерна кукурузы влажностью около 40% (урожай 2017 г) дрожжевыми и токсинообразующими грибами перед консервированием показал, что в нем присутствовали фузарии – $2,1 \times 10^5$ КОЕ/г. Токсикологическая оценка свидетельствовала о том, что в исходном сырье изучаемые микотоксины (Т-2 токсин, зеараленон, фумонизины группы В, афлатоксин В₁, охратоксин А) регистрировались в следовых количествах. Содержание микотоксина ДОН находилось на уровне, превышающем ПДК – 1,2 мг/кг, т.е. зерно было контаминировано в процессе вегетации и уборки.



Рисунок 1 – Микобиота консервированного влажного зерна кукурузы (представлена дрожжевыми грибами в анаэробных (0 экспозиция) и аэробных условиях хранения (7-14 суток при +4-8° С при разведении 1:10000)

Органолептические показатели консервированного зернового корма были в пределах нормы: без плесневого мицелия, с сохраненной структурой и цветом, запахом сухенных фруктов или моченых яблок. Проведенная диагностика и количественная оценка микробиологического со-

става консервированного зерна указывала на то, что при строгих анаэробных условиях хранения в нем не было грибов рода *Fusarium*. Однако при контакте с воздухом в течение 7-14 суток наблюдалось резкое повышение численности дрожжевых грибов по сравнению с первоначальным количеством с $8,8 \times 10^3$ до $5,8 \times 10^6$ - $2,4 \times 10^8$ КОЕ/г, а также появление пенициллов – $1,2 \times 10^5$ КОЕ/г (рис. 1).

Токсикологический анализ консервированного зерна, хранящегося в анаэробных условиях и при аэробной экспозиции 7-14 суток, свидетельствовала о присутствии только ДОНа, уровень которого был 1,7-1,8 мг/кг, и не выявил существенных изменений в контаминации его другими микотоксинами. Эти данные согласуются с результатами, полученными Лаптевым Г. Ю. и др. [4].

Полученные результаты консервирования оценивались по показателю актуальной кислотности (рН) силосованного корма. Через месяц его хранения в герметичных условиях кислотность была на уровне рН 4,66, а через три месяца – 4,90. Изучение динамики кислотности в разгерметизированных условиях хранения на 3-и, 7-е и 14-сутки показало дальнейшее повышение значения рН до 5,01; 6,07 и 6,50 соответственно в заготовленном без применения консервантов зерне. Плюсовая температура окружающей среды (+22° С) благоприятствовала еще более резкому увеличению изучаемого показателя – 6,10; 6,87 и 6,95, соответственно. Проведенные нами исследования свидетельствовали об аэробной нестабильности (вторичной ферментации) консервированного зерна кукурузы спонтанного брожения (без добавок).

При изучении зерна кукурузы, консервированного с внесением мочевины, численность дрожжевых грибов была $3,4 \times 10^5$ КОЕ/г в герметичных условиях и $1,2 \times 10^8$ КОЕ/г – при контакте с воздухом. Это подтверждает то, что мочевины не ограничивала развитие дрожжевых грибов. О невысоком фунгистатическом действии мочевины и создании дополнительной буферной емкости в корме указывалось ранее [1,8]. В отличие от контрольного образца в образце зерна с мочевиной отсутствовали пенициллы. Сразу после вскрытия готового корма с добавлением мочевины значение рН было на уровне 4,88, тогда как на 3-и, 7-е и 14-и сутки после разгерметизации кислотность существенно изменялась до 4,90; 5,73 и 8,56, соответственно, что является отрицательным моментом для дальнейшего хранения корма.

Использование при консервировании зерна биопрепарата на основе молочнокислых бактерий (ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси») позволяло поддерживать стабильный уровень кислотности в корме: рН 4,23-4,35, полностью ограничить рост дрожжевых и плесневых грибов в течение 3 месяцев хранения в анаэробных условиях и рН 4,35-4,54 – в аэробных.

Количественный состав микофлоры влажного зерна кукурузы, консервированного с помощью совместного использования биологического консерванта с мочевиной, был оптимальным для дальнейшего хранения. При разгерметизации и хранении более 7 суток в таких условиях стабилизирующее значение рН в зерне с биопрепаратом и мочевиной поддерживалось на уровне 4,40-4,60, а содержание дрожжевых грибов достигало безопасных значений в пределах $6,0 \times 10^3$ КОЕ/г.

Анализ химического состава показал, что более высокое содержание сырого протеина в сухом веществе консервированного зерна было в образцах корма с добавками, в частности с мочевиной – 8,45 %, максимальное – 8,63 %

при совместном внесении ее с биопрепаратом при длительном хранении в анаэробных условиях по сравнению с контролем (табл. 1). В герметичных условиях хранения зерна фракции сырого жира мало различались между вариантами – 4,48-4,60%. Однако в разгерметизированных условиях хранения (более 7 суток, при +22 °С) количе-

ство сырого жира снижалось в контрольном образце – с 4,60% до 3,12% и в варианте с мочевиной – с 4,59% до 3,06%; в остальных вариантах обработанного добавками зерна – сохранялось на том же первоначальном уровне. Сырая клетчатка и зола существенно не изменялись.

Таблица 1 – Качественные показатели консервированного зерна (3 месяца хранения в герметичных условиях), урожай 2017 г

№ п/п	Вариант	рН	В абсолютно сухом веществе, %				Обменная энергия (ОЭ), МДж/кг сухого вещества
			Сырой протеин	Сырой жир	Сырая клетчатка	Сырая зола	
1	Контроль (без добавок)	4,90	7,34	4,60	1,99	1,50	13,01
2	Биопрепарат, 0,06 мл/кг	4,23	7,31	4,48	1,76	1,48	13,02
3	Мочевина, 0,3 %	4,88	8,45	4,59	1,84	1,47	13,13
4	Биопрепарат + мочевина	4,40	8,63	4,52	1,91	1,48	13,15

Из зерна кукурузы урожая 2017 г с высокой влажностью (около 40%) был получен консервированный корм с содержанием обменной энергии 13,01 МДж/кг СВ без добавок и 13,02-13,15 МДж/кг СВ в зависимости от используемого консервирующего препарата. В разгерметизированных условиях (до 14 суток) отмечалась тенденция снижения уровня обменной энергии до 12,98 МДж/кг СВ в контрольном варианте (без добавок); этот показатель был 13,03-13,07 МДж/кг СВ в вариантах с добавками.

Микобиота исходного зерна влажностью 33-35 % (урожай 2018 г) с высоким уровнем контаминации плесневыми грибами была представлена фузариями ($6,7 \times 10^5$ КОЕ/г), кладоспориями ($1,1 \times 10^5$ КОЕ/г), а также пенициллами, аспергиллами ($7,0 \times 10^4$ КОЕ/г), дрожжевыми клетками ($1,7 \times 10^5$ КОЕ/г) и мукорами. Учет органолептических показателей консервированного корма из такого зерна без добавок в строгих анаэробных условиях через месяц хранения показал, что в нем регистрировался плесневый мицелий. В составе микофлоры были обнаружены дрожжи, число которых не снижалось ($2,3 \times 10^5$ КОЕ/г) и муконовые

грибы. Грибы рода фузарии более чувствительные к отсутствию кислорода, полностью подавлялись. Аналогичные результаты были получены нами при консервировании зерна кукурузы урожая 2016 года, когда при оптимальном уплотнении и герметизации происходила смена комплекса микофлоры, и ограничивалось развитие грибов рода *Fusarium* [2].

Количественная оценка присутствия продуктов метаболизма (микотоксинов) грибов – представлена в таблице 2. Показано, что хранение в анаэробных условиях влажного зерна кукурузы, в котором обнаружены следовые количества микотоксинов (проба 1), не приводило к существенному изменению токсикологических характеристик корма при консервировании. Вместе с тем, в пробе 2 кукурузы, контаминированной фузариями, происходят негативные процессы накопления микотоксинов группы трихотеценов – ДОН и Т-2 токсина, концентрации которых даже при анаэробных условиях хранения сохраняются на достаточно высоком уровне.

Таблица 2 – Содержание микотоксинов в пробах влажного зерна кукурузы до и после консервирования в анаэробных условиях, мг/кг (урожай 2018 г)

Варианты	ДОН	Зеараленон	Т-2 токсин	Фумонизин В	Афлатоксин В ₁	Охратоксин А
Исходное неконтаминированное зерно (проба 1)	<0,20	0,05	<0,03	<0,11	<0,002	<0,005
Исходное контаминированное зерно (проба 2)	0,85	0,08	>1,0	0,63	<0,002	<0,005
Консервированное неконтаминированное зерно (проба 1)	<0,20	0,06	<0,03	<0,11	<0,002	<0,005
Консервированное контаминированное зерно (проба 2)	1,50	0,08	0,38	0,52	<0,002	<0,005
ПДК *	1,00	1,00	0,10	5,00	0,02	0,05

* - допустимые уровни безопасности (ПДК) зерна кукурузы, поставляемого на кормовые цели (Ветеринарно-санитарные правила обеспечения безопасности кормов)

При этом контаминация зерна Т-2 токсином заметно снижается с 1,0 до 0,38 мг/кг, но превышает его допустимые концентрации в корме. В отношении ДОН, наиболее часто встречаемом опасном вторичном метаболите микроскопических грибов рода *Fusarium*, установлена его высокая устойчивость при хранении зараженного зерна, хотя его продуценты, как указывалось выше, не регистрируются с помощью микробиологического метода.

При высокой контаминации зерна микотоксинами хранящегося в герметичных условиях в течение месяца, происходили более значительные изменения фракции жира 5,06%, чем в неконтаминированном зерне – 5,48%.

Таким образом, установлено, что в условиях допускающего контакт с воздухом (более 7-14 суток), наблюдается активизация дрожжевых грибов ($5,8 \times 10^5$ - $2,4 \times 10^8$ КОЕ/г), а также пенициллов ($1,2 \times 10^5$ КОЕ/г), повышение значения показателя рН, снижение основных питательных веществ в силосованном зерне без консервантов, что свидетельствует об его аэробной неустойчивости (вторичной ферментации).

Применение препаратов для консервирования зерна позволяет добиться более высоких показателей по сравнению с зерном без их внесения: обеспечить снижение содержания в корме дрожжевых и плесневых грибов, повысить протеиновую (90 г сырого протеина на одну кормовую

единицу) и энергетическую питательность (13,15 МДж/кг сухого вещества).

Выявлено, что среди изученных микотоксинов (ДОН, Т-2 токсин, фумонизины группы В, зеараленон, ократоксин А, афлатоксин В₁), образовавшихся в процессе вегетации

кукурузы и попавших в корм, наибольшей стабильностью характеризуется ДОН, содержание которого не снижается в процессе консервирования зерна и составляет 1,5-1,7 мг/кг по сравнению с исходным зерном – 0,85-1,2 мг/кг.

Литература:

1. Абраскова С.В. Регуляция микробиоценоза консервируемых кормов. Монография. Минск: ИВЦ Минфина, 2011. – 174 с.
2. Абраскова С.В., Шашко Ю.К., Шашко М.Н., Кадырова М.В., Микробиологические аспекты обеспечения сохранности зерна кукурузы. Сб. статей по материалам 1 межд. н-п. конф. «Инновационный потенциал развития науки в современном мире» Вестник науки, 2017. – Уфа. – № 1 – С. 6-15.
3. Дуборезов В.М., Виноградов В.Н., Дуборезов И.В., Андреев И.В. Эффективность консервантов при хранении плющеного зерна кукурузы Кормопроизводство, – №3. – 2018. – С. 31-34.
4. Иоффе В.Б. Практика кормления молочного скота. Молодечно: Тип. «Победа», 2005. – 164 с.
5. Лаптев Г.Ю., Новикова Н.И., Ильина Л.А. и др Динамика накопления микотоксинов в силосе на разных этапах хранения. Сельскохозяйственная биология, 2014. – Т.49. – №6.-. – С. 123-130.
6. Монастырский О.А. Разработка биопрепаратов для защиты посевов и зерна злаковых культур от поражения токсигенными грибами и накопления опасных микотоксинов. Экоинформ, 2004. – №2. – С.5-18.
7. Скобликов Н.Э., Улетова Н.П., Кузнецова Т.К., Глазов А.Ф. Микробиологические показатели качества кормов, консервированных с использованием различных кисломолочных заквасок. Сб. науч. трудов – Северо-Кавказский научно-исследовательский ин-т животноводства, 2006. – С. 36–40.
8. Петровская В.А., Дарбаев А.Л. Консервирование и обогащение азотом (мочевины) силосованных кормов. Сб. науч. работ. – Саратовский СХИ, 1976. – Вып. 81. – С. 53-64.
9. Пономаренко, Ю.А. Питательные и антипитательные вещества в кормах Минск: Экоперспектива, 2007. – 960 с.
10. Яковчик, Н.С. Кормопроизводство. Современные технологии Барановичская укрупненная типография, 2004.-278 с.
11. Barry, T. Some observations on aerobic deterioration in untreated silages and in silages made with formaldehyde-containing additives J. Sci. Food Agr. , 1980. – Vol. 31. – No.2. – P. 133-136.
12. Beck, Th. Beeinflussung der Nachgrudung durch Siliermitteln Das wirtschaftseig. Futter., 1975. – Bd. 2l. – No.1. – S. 55-65.