

Гигиена питания

© ЦИКУНИБ А.Д., ГРИНЬ И.А., 2018

УДК 614.31:63(470.621)

Цикуниб А.Д., Гринь И.А.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ КОНТАМИНАЦИИ *ASPERGILLUS FLAVUS* И АФЛАТОКСИНОМ B_1 ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ, ПРОИЗВОДИМЫХ И РЕАЛИЗУЕМЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ АДЫГЕЯ

ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет», 385000, Майкоп

Введение. Целью исследования стало изучение распространения *A. flavus* и уровня контаминации афлатоксинами пищевых продуктов, производимых и реализуемых на территории Республики Адыгея.

Материал и методы. Проведены исследования уровня контаминации пищевых продуктов плесневыми грибами, в том числе *A. flavus* и афлатоксином B_1 . Микробиологический посев проводили на питательную среду Чапека, идентификацию *A. flavus* – по Л.И. Курсанову, качественное определение содержания афлатоксина B_1 в культуральной жидкости и пищевых продуктах проводили ТСХ-методом на пластинках «Силуфол» УФ-254, количественное – высокоэффективной жидкостной хроматографией на Agilent Technologies серии 1200.

Результаты. Установлено, что из 17 исследованных проб 23,5% были загрязнены плесневыми грибами, из них 11,3% контаминированы *A. flavus*, в одной пробе, из которой был выделен токсигенный штамм *A. flavus*, обнаружен афлатоксин B_1 в концентрации $0,0072 \pm 0,00028$ мг/кг.

Заключение. Полученные данные показывают возможность контаминации пищевых продуктов, в особенности импортируемых, микроскопическим плесневым грибом *A. flavus* и афлатоксином B_1 , что делает актуальным, особенно для южных регионов, проведение целенаправленного, более углублённого мониторинга за распространённостью данного плесневого гриба.

Ключевые слова: *Aspergillus flavus*; микотоксины; афлатоксин B_1 .

Для цитирования: Цикуниб А.Д., Гринь И.А. Определение уровня контаминации *Aspergillus flavus* и афлатоксином B_1 пищевых продуктов, производимых и реализуемых на территории Республики Адыгея. *Гигиена и санитария*. 2018; 97(3): 251-253. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-3-251-253>

Для корреспонденции: Цикуниб Аминет Джахфаровна, доктор биол. наук, проф., зав. кафедрой химии АГУ, директор НИИ комплексных проблем АГУ. E-mail: cikunib58@mail.ru

Tsikunib A.D., Grin I.A.

DETERMINATION OF THE LEVEL OF FOOD CONTAMINATION WITH *ASPERGILLUS FLAVUS* AND AFLATOXIN B_1 IN THE TERRITORY OF THE ADYGEYA REPUBLIC

Adygeya State University, Maykop, 385000, Russian Federation

Investigations were executed to determine the level of the food contamination with mold fungi, to identify *A. flavus* and to assess the concentration of aflatoxin B_1 . Culturing is performed on Capek culture medium, *A. flavus* is identified according to L.I. Kursanov, the qualitative estimation of aflatoxin B_1 in liquid culture and food products was carried out with the use of thin-layer chromatography method on "Silufol" UV-254 plates, and quantification was made by high-performance liquid chromatography (Agilent Technologies 1200 series). Out of 17 investigated samples, 23.5% were established to be mold fungi-contaminated, of which 11.3% were contaminated with *A. flavus*. In one sample, isolated from *A. flavus* toxigenic strain, aflatoxin B_1 was detected in the concentration of 0.0072 ± 0.00028 mg/kg.

Key words: *Aspergillus flavus*; mycotoxins; aflatoxin B_1 .

For citation: Tsikunib A.D., Grin I.A. Determination of the level of food contamination with *Aspergillus flavus* and aflatoxin B_1 in the territory of the Adygeya Republic. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2018; 97(3): 251-253. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-3-251-253>

For correspondence: Aminet D. Tsikunib, MD, Ph.D., DSci., professor, Head of the Department of Chemistry of the Adygeya State University, Director of the Institute for Complex Problems of the Adygeya State University, Maykop, 385000, Russian Federation. E-mail: cikunib58@mail.ru

Information about authors: Tsikunib A.D., <http://orcid.org/0000-0002-7491-0539>; Grin I.A., <http://orcid.org/0000-0001-5690-2407>.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received: 20 January 2017

Accepted: 18 October 2017

Введение

Основами государственной политики РФ в области здорового питания населения, утверждёнными распоряжением правительства РФ № 1873-р от 2010 г., предусмотрено расширение отечественного производства основных видов продовольственного сырья, отвечающего современным требованиям качества и безопасности. Согласно данным ФАО и ВОЗ актуальной проблемой является контаминация сельскохозяйственного сырья и

пищевой продукции плесневыми грибами, приводящая к существенным потерям продовольствия [15, 16]. При этом среди плесневых грибов наибольшую гигиеническую значимость представляет *Aspergillus flavus*, обладающий мощной ферментативной системой и продуцирующий наиболее токсичные метаболиты – афлатоксины [11]. Многочисленными исследованиями установлено, что афлатоксины, в особенности афлатоксин B_1 , обладают высокими канцерогенным, иммунодепрессивным, тератогенным, нейротоксическим и цитотоксическим действиями

при постоянном поступлении афлатоксинов с пищей развивается гепатокарцинома [1, 3, 8, 12, 13].

A. flavus распространён повсеместно, но преимущественно в регионах с умеренным и влажным климатом [2]. Основные поражаемые им продукты – арахис, кукуруза, злаки и высокомасличные культуры [4]. В России объёмы зерна, загрязнённые плесневыми грибами и их токсинами, за последние годы увеличились в десятки раз. Так, по данным Смирновой И.Р. с соавторами, за период с 2008 по 2009 гг. уровень контаминации токсигенными грибами проб зерна, отобранных в Центральном, Центрально-Чернозёмном, Волго-Вятском и Поволжском регионах РФ, достигал 5,0–74,7%, кормов сельскохозяйственной продукции, продуктов питания – 40–60%, а более 30% кормов и другой сельскохозяйственной продукции были загрязнены микотоксинами [10].

Распространённость плесеней, в том числе *A. flavus*, обусловлена рядом причин: загрязнение может произойти на любой стадии производства, в особенности на этапах сборки, хранения и переработки сырья. Следует также отметить, что афлатоксины не подвергаются разрушению под действием температуры или других методов технологической обработки, сохраняя свою токсичность [6, 7, 14].

В последние годы возросло внимание к проблеме изучения распространённости *A. flavus* и уровню контаминации афлатоксинами пищевых продуктов. Так, с 2010 по 2015 г. количество публикаций по данной тематике выросло с 133 до 220 в Европейских странах, с 165 до 280 в странах Юго-Восточной Азии [17]. Наибольшее количество исследований приходится на страны с высоким риском контаминации пищевых продуктов токсигенными штаммами *A. Flavus*. В России исследования по распространённости *A. flavus* носят разрозненный характер, а данные по южным регионам, в том числе Республике Адыгея, практически отсутствуют. Проблема усугубляется тем, что за последние десятилетия существенно выросла доля импортной продукции, в том числе из стран с благоприятными для роста плесневых грибов климатическими условиями.

Исходя из вышеизложенного, целью исследования стало изучение распространения *A. flavus* и уровня контаминации афлатоксинами пищевых продуктов, производимых и реализуемых на территории Республики Адыгея.

Материал и методы

Исследование проходило на базе НИИ комплексных проблем АГУ в лаборатории нутрициологии и экологии. Для исследования уровня контаминации пищевых продуктов плесневым грибом *A. flavus* было отобрано 17 проб разных продуктов: хлеб – 3, крупа гречневая – 2, арахис – 4, специи – 1, грецкий орех – 3, козинак подсолнечный – 2, курага – 1, орех бразильский – 1. Отбор проб проводили на центральном рынке г. Майкоп, а также в сети магазинов «Магнит» в соответствии с требованиями ГОСТ 33303-2015. Микробиологический посев проводили на питательную среду Чапека по ГОСТ 26670, идентификацию

Результаты исследований микопейзажа пищевых продуктов

Дата отбора	Наименование пробы	Страна-производитель	ПДК плесеней, КОЕ/г	Количество плесневых грибов, КОЕ/г	Видовой состав
04.12.15	Хлеб «Даниловский»*	Россия	100	13	<i>Mucor sp.</i> – 4 <i>Fusarium sp.</i> – 3 <i>Penizillium sp.</i> – 6
17.02.16	Хлеб «Бородинский»**	Россия	100	12	<i>A.niger</i> – 9 <i>Mucor sp.</i> – 3
17.02.16	Хлеб «Белореченский»*	Россия	100	< 5	–
25.03.16	Крупа Гречневая**	Россия	100	0	–
17.02.16	Крупа Гречневая*	Россия	100	< 5	–
07.04.16	Арахис индийский**	Индия	1000	12	<i>A.flavus</i> – 1 <i>A.niger</i> – 1 <i>Penizillium sp.</i> – 9
17.02.16	Арахис «Ореховая роща» *	Россия	1000	< 5	–
25.03.16	Арахис**	Бразилия	1000	160	<i>A.niger</i> – 120 <i>Penizillium sp.</i> – 40
25.03.16	Арахис**	Россия	1000	0	–
07.04.16	Специи «Армянская приправа**	Без маркировки	1000	150	<i>A.flavus</i> – 130 <i>A.niger</i> – 20
04.12.15	Грецкий орех «Ореховая роща» *	Россия	1000	< 5	–
25.03.16	Грецкий орех**	Россия	1000	13	<i>A.niger</i> – 7 <i>Mucor sp.</i> – 4 <i>Penizillium sp.</i> – 1
25.03.16	Грецкий орех**	Россия	1000	13	<i>A.niger</i> – 8 <i>Mucor sp.</i> – 5
13.01.16	Козинаки подсолнечные*	Россия	50	0	–
13.01.16	Козинаки подсолнечные*	Россия	50	< 5	–
07.16.16	Курага**	Россия	500	< 5	–
07.06.16	Орех бразильский**	Бразилия	1000	0	–

Примечание. * – приобретен в магазине «Магнит», ** – приобретен в ЦР г. Майкопа.

проводили на 7-й день по Л.И. Курсанову [5] с учётом следующих показателей: хорошо развитый ветвящийся мицелий с многочисленными септами; конидиеносцы не септированы, верхние концы шаровидно расширены в виде небольшой головки, как правило, с двумя рядами стеригм, каждая из которых несёт несколько рядов конидий (спор), форма колонии правильная, края ровные, цвет обусловлен окраской конидий, желто-зелёный с преобладанием зелёного. Выделенные штаммы *A. flavus* изолировали в чистую культуру на косяки среды Чапека. Для определения токсигенности выбирали колонии по свойству питательной среды флуоресцировать в УФ-свете вокруг колоний. Выделенные штаммы культивировали на жидкой среде Чапека – Докса в течение 10 дней при $t = 30-31^{\circ}\text{C}$. Экстракцию афлатоксинов проводили хлороформом в соотношении 1:1, далее на пластинку «Силуфол» УФ-254 наносили по 10 мкл экстрактов и стандартного раствора афлатоксина В₁, хроматографировали в системе хлороформ : ацетон (9:1), пластинку подсушивали и рассматривали под УФ с $\lambda 365 \text{ нм}$ [9]. Идентификацию афлатоксина проводили по голубым флуоресцирующим пятнам, совпадающим по величине Rf со стандартом, и подтверждающим тестам. Количественное определение содержания афлатоксина В₁ проводили согласно ГОСТ 30711 на жидкостном хроматографе Agilent Technologies-1200. Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программного пакета Microsoft Office Excel 2016.

Таблица 2

Результаты количественного определения афлатоксина В₁ в пищевых продуктах

Наименование пробы	Содержание афлатоксина В ₁ , мг/кг
Арахис	Не обнаружено
Специя «Армянская приправа»	0,0072 ± 0,00028
Грецкий орех «Ореховая рошца»	Не обнаружено
Грецкий орех	Не обнаружено
Грецкий орех	Не обнаружено
Козинаки подсолнечные	Не обнаружено
Козинаки подсолнечные	Не обнаружено
Орех бразильский	Не обнаружено
Хлеб «Даниловский»	Не обнаружено
Хлеб «Бородинский»	Не обнаружено
Хлеб «Белореченский»	Не обнаружено
Крупа гречневая	Не обнаружено
Крупа гречневая	Не обнаружено
Арахис индийский	Не обнаружено
Арахис «Ореховая рошца»	Не обнаружено
Арахис	Не обнаружено

Результаты

Исследования количественного и качественного состава микрофлоры различных проб пищевых продуктов позволили выявить продукты, которые являются группой риска по развитию плесневых грибов и установить особенности их микопейзажа (табл. 1.)

В исследуемых пробах также было проведено количественное определение афлатоксина В₁ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Полученные результаты представлены в табл. 2.

Обсуждение

Из полученных данных, представленных в табл. 1 мы видим, что из 17 исследованных проб 4 пробы (23,5%) были загрязнены плесневыми грибами, из них 2 пробы (11,3%) оказались контаминированы *A. flavus*: это арахис, произведённый в Индии и специя «Армянская приправа», реализуемая на развес без маркировки. Из всех колоний, идентифицированных как *A. flavus*, в чистую культуру было выделено 14 штаммов, из них с арахиса – 1, с специи – 13, в том числе образующих склероции – 28,6%, не образующих склероции – 71,4%, рыхлах – 21,4% и более гладких – 72,6%, с преобладанием в спороносной зоне зелёного – 71,6% или жёлтого – 21,4% цвета, и определён их токсигенный потенциал. Установлено, что один из четырёх штаммов *A. flavus*, выделенный из специи «Армянская приправа», является токсигенным, продуцирующим афлатоксин В₁. Токсигенный потенциал данного штамма *A. flavus* в пересчёте на количество афлатоксина В₁ в культуральной жидкости составил 0,93 мг%.

Как видно из табл. 2, во всех пробах, не контаминированных *A. flavus*, афлатоксин В₁ не обнаружен. В пробе арахиса индийского, в которой был обнаружен *A. flavus*, но в малых количествах (всего 1,0% от ПДК на общее количество плесеней) и не токсигенный, афлатоксин В₁ также не обнаружен. Однако в пробе специи «Армянская приправа», уровень контаминации которой составил 13% от ПДК, и из которой был выделен токсигенный штамм, был обнаружен афлатоксин В₁ в концентрации 0,0072 ± 0,0028 мг/кг, т. е. 1,44 ПДК для уровня афлатоксина В₁ в пищевых продуктах.

Заключение

Полученные данные показывают возможность контаминации пищевых продуктов, в особенности импортируемых, микроскопическим плесневым грибом *A. flavus* и афлатоксином В₁, что делает актуальным, особенно для южных регионов, проведение целенаправленного, более углублённого мониторинга за распространённостью данного плесневого гриба.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.
Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература (пп 12-15, 17 см. References)

- Афонюшкин В.Н., Леонов С.В., Городов В.С., Морозов К.В., Дударева Е.В. Микотоксикозы: значение, диагностика, борьба. *Архив ветеринарных наук.* 2005; 6(53): 27-34.
- Билай В.И., Подопличенко Н.М. Аспергиллотоксикозы. В кн.: Билай В.И., Подопличенко Н.М. *Токсинообразующие микроскопические грибы.* Киев: Наукова думка; 1970: 104-29.
- Билай В.И., Подопличенко Н.М. *Токсинообразующие микроскопические грибы.* Киев: Наукова думка; 1970.
- Григорьева Р.З. *Безопасность продовольственного сырья и продуктов питания. Учебное пособие.* Кемерово: КемТИПП; 2004.
- Курсанов Л.И. *Пособие по определению грибов из родов Aspergillus и Penicillium.* Москва: Медгиз; 1947.
- Кононенко Г.П. Фузариотоксины в зерне колосовых культур: региональные особенности. В кн.: Кононенко Г.П., Буркин А.А. *Успехи медицинской микологии. т.1.* М.: Национальная академия микологии; 2003: 141-4.
- Монастырский О.А. Токсинообразующие грибы, паразитирующие на зерне. *Агро XXI.* 2001; 11: 6-7.
- Маянский А.Н. *Введение в медицинскую микологию: учебно-методическое пособие.* Н. Новгород: НГМА; 2000.
- Билай В.И. *Методы экспериментальной микологии: справочник.* Киев: Наукова думка; 1982: 309-12.
- Смирнова И.Р., Михалев А.В., Сатиюкова Л.П., Борисова В.С. Современное состояние качества и безопасности кормов в России. *Ветеринария.* 2009; 2: 3-7.
- Тутельян В.А., Кравченко Л.В. *Микотоксины (медицинские и биологические аспекты).* М.: Медицина; 1985.
- ВОЗ/Всемирная организация здравоохранения. Available at: <http://www.who.int.ru>

References

- Afonyushkin V.N., Leonov S.V., Gorodov V.S., Morozov K.V., Dudareva E.V. Mikotoksikozy: znachenie, diagnostika, bor'ba. *Arkhiv veterinarnykh nauk.* 2005; 6(53): 27-34. (in Russian)
- Bilay V.I., Podoplichenko N.M. Aspergillotoksikozy. In: Bilay V.I., Podoplichenko N.M. *Toksinoobrazuyushhie mikroskopicheskie griby.* Kiev: Naukova dumka; 1970: 104-29. (in Russian)
- Bilay V.I., Podoplichenko N.M. *Toksinoobrazuyushhie mikroskopicheskie griby.* Kiev: Naukova dumka; 1970. (in Russian)
- Grigoryeva R.Z. *Bezopasnost' prodovol'stvennogo syr'ya i produktov pitaniya. Uchebnoe posobie.* Kemeroovo: KemTIPP; 2004. (in Russian)
- Kursanov L.I. *Posobie po opredeleniyu gribov iz rodov Aspergillus i Penicillium.* Moscow: Medgiz; 1947. (in Russian)
- Kononenko G.P. Fuzariotoksiny v zerne kolosovykh kul'tur: regional'nye osobennosti. In: Kononenko G.P., Burkin A.A. *Uspekhi meditsinskoy mikologii. t. 1.* Moscow: Natsional'naya akademiya mikologii; 2003: 141-4. (in Russian)
- Monastyrskiy O.A. Toksinoobrazuyushchie griby, parazitiruyushchie na zerne. *Agro XXI.* 2001; (11): 6-7. (in Russian)
- Mayanskiy A.N. *Vvedenie v meditsinskuyu mikologiyu: uchebno-metodicheskoe posobie.* N. Novgorod: NGMA; 2000. (in Russian)
- Bilay V.I. *Metody eksperimental'noy mikologii: spravochnik.* Kiev: Naukova dumka; 1982: 309-12. (in Russian)
- Smirnova I.R., Mikhalev A.V., Satiukova L.P., Borisova V.S. Sovremennoe sostoyanie kachestva i bezopasnosti kormov v Rossii. *Veterinariya.* 2009; (2): 3-7. (in Russian)
- Tutel'yan V.A., Kravchenko L.V. *Mikotoksiny (meditsinskie i biologicheskie aspekty).* Moscow: Meditsina; 1985. (in Russian)
- Bakheet S.A., Alhuraishi A.M., Al-Harbi N.O., Al-Hosaini K.A., Al-Sharary S.D., Attia M.M. et al. Alleviation of aflatoxin B1-induced genomic damage by proanthocyanidins via modulation of DNA repair. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2016; 30(11): 559-66. doi: 10.1002/jbt.21823.
- Ghufran M., Ghosh K., Kanade S.R. Aflatoxin B1 induced upregulation of protein arginine methyltransferase 5 in human cell lines. *Toxicol.* 2016; 119: 117-21. doi: 10.1016/j.toxicol.2016.05.015.
- Gupta D., Sharma Y.P., Bala P. Mycoflora and natural aflatoxin contamination in dried quince seeds from Jammu, India. *J. Environ. Biol.* 2016; 37(1): 101-6.
- Food and agriculture organization of the United Nations. Available at: <http://www.fao.org>
- ВОЗ/Всемирная организация здравоохранения. Available at: <http://www.who.int.ru> (in Russian)
- <http://www.webofknowledge.com>