

**Микотоксикология и санитария кормов**

УДК 636.086.1:636.085.19:632.4(470)

doi: 10.15389/agrobiology.2017.6.1279rus

**ВИДОВОЙ СОСТАВ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРИБОВ РОДА *Aspergillus*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ГРУБЫХ КОРМОВ****Г.П. КОНОНЕНКО, Е.А. ПИРЯЗЕВА, Е.В. ЗОТОВА, А.А. БУРКИН**

Проблема обеспечения безопасности грубых кормов, ежегодно в больших масштабах пополняющих базу российского кормопроизводства, вызывает обеспокоенность специалистов в связи со множественной сочетанной контаминацией микотоксинами и обширным распространением токсигенных грибов. Недавно установлено, что в этих кормах доминирующая роль среди фузариевых грибов принадлежит *F. sporotrichioides*, продукты метаболизма которого (Т-2 токсин и диацетоксисцирпенол) способны вызывать острые отравления животных. Цель настоящей работы, которая стала следующим этапом в изучении основных токсинообразующих микромицетов из грубых кормов, — выяснение видовой состава, встречаемости и продуцирующей способности грибов рода *Aspergillus* в экспериментальных условиях, обеспечивающих наиболее полную реализацию их потенциала. Объектами микологического анализа были 258 средних образцов от производственных партий сена и соломы, заготовленных в животноводческих хозяйствах Брянской (2011 год) и Московской (2013 год) областей. Изоляты с установленной видовой принадлежностью культивировали на агаре Чапека-Докса (ЧДА), суловом агаре (СА) и увлажненном зерне риса (ЗР) в течение 7 сут при 23 °С. Содержание стеригматоцистина (СТЕ), эмолина (ЭМО), афлатоксина В<sub>1</sub> (АВ<sub>1</sub>), окрахтоксина А (ОА), микофеноловой кислоты (МФК), циклопизановой кислоты (ЦПК), эргоалкалоидов (ЭА), дезоксиниваленола (ДОН) и фумонизинов (ФУМ) в экстрактах мицелиально-споровой биомассы определяли методом иммуноферментного анализа с помощью аттестованных тест-систем. Для оценки токсинообразования использовали 32 изолята 12 видов грибов рода *Aspergillus* из сена и соломы, а также 27 изолятов *A. flavus* Link, *A. pseudoglaucus* Blochwitz, *A. repens* de Bary, выделенных ранее из зерновых кормов. Грибы рода *Aspergillus* встречались в образцах с частотой 62,0 % и интенсивностью инфицирования 1,7-100 %. Полученные изоляты относились к 15 видам, входящим в 10 таксономических групп с наибольшим видовым разнообразием в группе *A. glaucus* (4 вида). По распространенности лидировали виды *A. flavus* и *A. niger* van Tieghem (более 50,0 % пораженных проб), далее следовали *A. versicolor* (Vuill.) Tiraboschi, *A. pseudoglaucus*, *A. amstelodami* (Mangin) Thom & Church, *A. ochraceus* Wilhelm и *A. wentii* Vehmer (10,6-18,8 %), *A. nidulans* Eidam (6,3 %), остальные 7 видов — *A. candidus* Link, *A. tamarii* Kita, *A. sydowii* (Bain. & Sart.) Thom & Church, *A. fumigatus* Fresenius, *A. repens*, *A. terreus* Thom, *A. chevalieri* (Mangin) Thom & Church встречались реже (< 5 %). На ЧДА и ЗР интенсивность образования ЦПК (*A. flavus*) и МФК (*A. pseudoglaucus*, *A. repens*) была вполне сопоставимой. В сравнении с СА на ЗР происходило более активное накопление большинства микотоксинов — СТЕ (*A. versicolor*, *A. nidulans*), ЦПК (*A. flavus*, у всех 5 изолятов *A. tamarii* продуцирование ЦПК удалось выявить только на этом субстрате) и ЭМО (*A. sydowii*). Для биосинтеза МФК у *A. pseudoglaucus* и *A. repens* предпочтительным оказался СА. Тестирование грибов на трех питательных средах позволило установить, что к загрязнению грубых кормов СТЕ, ЦПК и МФК может иметь отношение комплекс грибов рода *Aspergillus*, включающий 7 видов, источник контаминации кормов ЭМО среди грибов рода *Aspergillus* найти не удалось. Только два из трех изолятов *A. sydowii* продуцировали его в малых количествах 120±20 и 245±40 нг/г. Остальные анализированные микотоксины у изолятов не были обнаружены. Обсуждается возможность участия грибов другой систематической принадлежности в контаминации кормов СТЕ, ЦПК, МФК и ЭМО, поскольку за последние годы кластеры, кодирующие биосинтез микотоксинов, найдены у микромицетов из генетически удаленных групп.

Ключевые слова: сено, солома, грибы рода *Aspergillus*, микотоксины.

Негативное воздействие микроскопических грибов рода *Aspergillus* на животных проявляется не только в виде микозов — заболеваний, вызываемых патогенными видами (1, 2), но и отравлений продуктами метаболизма с широким спектром повреждающего действия, включая нейротоксичность с треморгенным эффектом, гепато- и нефротоксичность (3, 4). Несмотря на неоднократно полученные свидетельства о значительной пораженности кормов этими грибами, риски, связанные с аспергиллотоксикозами, до сих пор остаются неясными. В мировой литературе можно найти сведения о токсинообразовании для отдельных видов грибов этого рода, однако они получены, как правило, для малого числа изолятов, в разных условиях и чаще всего по одному или немногим близкородственным токсинам (5, 6). Все это созда-

ет затруднения или делает невозможным даже приблизительный анализ ситуаций, которые могут возникать при кормлении и содержании животных.

Грубые корма, ежегодно в больших масштабах пополняющие базу российского кормопроизводства, вызывают обеспокоенность специалистов в связи с множественной сочетанной контаминацией микотоксинами (7, 8) и обширным распространением грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* и многих других, в том числе токсигенных видов. Недавно установлено, что доминирующая роль среди фузариевых грибов в этих кормах принадлежит *F. sporotrichioides* (9), продукты метаболизма которого — Т-2 токсин и ди-ацетоксисцирпенол способны вызывать острые отравления животных.

Мы впервые провели направленный поиск токсинообразующих грибов рода *Aspergillus* среди видов, участвующих в поражении сена и соломы. Новый подход к тестированию изолятов на альтернативных ростовых средах позволил подтвердить возможность биосинтеза микотоксинов у 7 видов *Aspergillus* из 15 идентифицированных в составе микобиоты. Особый интерес представляют данные по редко встречающимся видам *A. tamarisii*, *A. repens* и *A. wentii*, поскольку информация относительно их токсигенного потенциала весьма ограничена.

Целью работы было изучение видового состава грибов рода *Aspergillus* в грубых кормах и оценка токсинпродуцирующей способности этих изолятов в экспериментальных условиях, обеспечивающих наиболее полную реализацию их потенциала.

**Методика.** Объектами микологического анализа были 258 средних образцов от производственных партий сена и соломы, заготовленных в животноводческих хозяйствах. Из Брянской области (8 районов, 2011 год) было получено 14 образцов сена (злаки, луговые травы, райграсс, разнотравье) и 5 образцов соломы (состав не указан); из Московской области (31 район, 2013 год) — 230 образцов сена (разнотравье, злаки, многолетние травы, сборное, луговое, тимофеевка, злаково-бобовое, костер, люцерна, овсяница, вика, козлятник, клевер) и 9 образцов соломы (вико-овсяная, злаковая, пшеничная, овсяная). Материал для посева подготавливали, как описано ранее (9). Каждый образец нарезали на фрагменты длиной около 2 см и тщательно перемешивали. В три чашки Петри раскладывали по 20 фрагментов, соблюдая примерно одинаковые расстояния между ними. Агар Чапека содержал медицинскую консервированную желчь (10 %) и антибиотики (50 тыс. ЕД пенициллина и 100 тыс. ЕД стрептомицина на 1 л среды). Затем чашки помещали в термостат при 25 °С. Через 5-7 сут подсчитывали число фрагментов с признаками поражения грибами *Aspergillus*, вычисляли процентное содержание от общего числа и начинали выделение чистых культур. Для этого колонии, относящиеся по культуральным признакам к роду *Aspergillus*, высевали в чашки Петри с тем же агаром, а через 5-7 сут после подтверждения чистоты отсеивали на скошенный агар Чапека-Докса (ЧДА). Видовую идентификацию грибов осуществляли по определителю (10).

Методика оценки токсинообразования грибов включала подготовку инокулюма, субстрата, посев, культивирование, экстракцию и анализ микотоксинов. В качестве посевного материала использовали 10-суточные культуры грибов на ЧДА. Инокулюм примерно равного размера, взятый с поверхности агара микологическим крючком, помещали в три флакона объемом 10 мл с диаметром дна около 18 мм, каждый из которых содержал по 1 г стерильного дробленого зерна риса, предварительно увлажненного добавлением 1 мл воды, а также в три флакона с 1,5 мл ЧДА или суслового агара (СА) (Wort agar, «Liofilchem», Италия). Флаконы закрывали ватно-марлевыми пробками, которые плотно оборачивали лабораторной пленкой Parafilm M® (PM-996, «Pechiney Plastic Packaging», США).

Культивирование проводили в темноте в течение 7 сут при 23 °С. Затем в каждый флакон добавляли смесь ацетонитрила и воды (объемное соотношение 84:16) и интенсивно встряхивали в начале и конце 14-часовой стационарной экстракции. Содержание стеригматоцистина (СТЕ), эмодаина (ЭМО), афлатоксина В<sub>1</sub> (АВ<sub>1</sub>), охратоксина А (ОА), микофеноловой кислоты (МФК), циклопиазоновой кислоты (ЦПК), эргоалкалоидов (ЭА), дезоксиэваленола (ДОН) и фумонизинов (ФУМ) в экстрактах определяли методом иммуноферментного анализа с помощью аттестованных тест-систем (11), нижние пределы чувствительности определения соответствовали 85 % связыванию антител. Для оценки токсинообразования использовали 32 изолята 12 видов грибов рода *Aspergillus* из сена и соломы, а также 27 изолятов *A. flavus*, *A. pseudoglaucus*, *A. repens*, выделенных ранее из зерновых кормов и принадлежащих исследовательской коллекции (Все-российский НИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии).

Полученные данные анализировали методами описательной статистики в программе Microsoft Excel 2013. В таблицах приведены средние арифметические значения ( $\bar{X}$ ) и ошибки выборочной средней ( $s$ ).

**1. Видовой состав и распространенность грибов рода *Aspergillus* в грубых кормах (сено, солома), заготовленных в Брянской (8 районов, 2011 год) и Московской (31 район, 2013 год) областях ( $n = 160$ )**

Группа	Вид	Частота встречаемости, %
<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i> Link	56,3
	<i>A. tamarii</i> Kita	3,1
<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> van Tieghem	54,4
<i>A. versicolor</i>	<i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tira-boschi	18,8
	<i>A. sydowii</i> (Bain. & Sart.) Thom & Church	2,5
<i>A. glaucus</i>	<i>A. pseudoglaucus</i> Blochwitz	15,6
	<i>A. amstelodami</i> (Mangin) Thom & Church	10,6
	<i>A. repens</i> de Bary	1,9
	<i>A. chevalieri</i> (Mangin) Thom & Church	0,6
<i>A. ochraceus</i>	<i>A. ochraceus</i> Wilhelm	15,0
<i>A. wentii</i>	<i>A. wentii</i> Vehmer	14,4
<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i> Eidam	6,3
<i>A. candidus</i>	<i>A. candidus</i> Link	4,4
<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> Fresenius	2,5
<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i> Thom	0,7
Не определена	<i>Aspergillus</i> spp.	3,8

Примечание.  $n$  — число проб, пораженных аспергиллами.

*Результаты.* Грибы рода *Aspergillus* присутствовали в 62,0 % из 258 исследованных проб с интенсивностью инфицирования от 1,7 до 100 %. После выделения в чистые культуры изоляты грибов этого рода были отнесены к 15 видам, входящим в 10 таксономических групп (табл. 1). Видовое разнообразие оказалось наибольшим в группе *A. glaucus* — 4 вида (*A. pseudoglaucus*, *A. repens*, *A. amstelodami*, *A. chevalieri*), в остальных обнаружили по 1-2 вида. Идентифицировать до вида изоляты из 13 проб не удалось из-за утраты культур на ранних этапах выделения, однако по предварительной оценке 7 из них относились к группе *A. glaucus*.

По частоте обнаружения лидировали виды *A. flavus* и *A. niger* (более 50,0 % пораженных проб), далее следовали *A. versicolor*, *A. pseudoglaucus*, *A. amstelodami*, *A. ochraceus* и *A. wentii* (10,6-18,8 % проб), *A. nidulans* (6,3 %), остальные 7 видов — *A. candidus*, *A. tamarii*, *A. sydowii*, *A. fumigatus*, *A. repens*, *A. terreus* и *A. chevalieri* встречались еще реже (< 5 %). Эти результаты в целом совпадали с полученными ранее на других территориях — в Рязанской Мещере (12), Татарстане (13, 14), Дагестане (15), Северной Осетии (16) и Амурской области (17), а также в бывших республиках СССР — Украине (18), Белоруссии (19), Литве (20), Армении (21, 22), Казахстане (23) и Азербайджане (24, 25). Во всех исследованиях сообщалось, что грибы рода *Aspergillus* доминируют в составе микобиоты грубых кормов и представлены многими видами с преобладанием *A. flavus* и *A. niger*. Сходство, хотя и с некоторыми различиями, касалось и сопутствующих видов — *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *A. candidus*, *A. wen-*

tii, группы *A. glaucus*. Среди редких находили *A. clavatus* (16, 18, 21, 25), *A. flavipes* (22), *A. oryzae* и *A. ustus* (16).

По-видимому, комплекс видов *Aspergillus* и наблюдаемое соотношение между ними были следствием длительных конкурентных взаимосвязей грибов и формировалось в процессе высушивания травостоя. Трудно предположить, чтобы у такого многообразия вегетирующих растений подверженность воздействию грибов была настолько одинаковой. Понятно, что на живых растениях могли активно развиваться иные виды, а те, что доминировали в итоге, — иметь при вегетации второстепенное значение. По нашему мнению, этот научный факт и высказанное предположение заслуживают особого внимания, поскольку указывают на необходимость учета биосинтетического потенциала не только распространенных, но и редко выявляемых видов для корректного прогнозирования рисков контаминации кормов.

Методология оценки токсинообразования для этой группы грибов, по доступным нам сведениям, не была предметом специального изучения. Тем не менее, в других работах для тестирования и препаративного получения микотоксинов использовалась среда Чапека-Докса (26), оценка изолятов *A. ochraceus* проводилась на зерне риса (27, 28), а некоторые виды грибов были дифференцированы по способности к накоплению ЭМО (29), ЦПК (30, 31) и МФК (32) при культивировании изолятов на суловом агаре (СА). Для токсинообразующих представителей трех видов из исследовательской коллекции при прочих равных условиях (7 сут, 23 °С) нами были испытаны СА, ЧДА и увлажненное зерно риса (ЗР) (табл. 2). Во всех случаях продуцирование ЦПК (*A. flavus*) и МФК (*A. pseudoglaucus* и *A. repens*) на рисе и ЧДА было сходным, тогда как на СА образование ЦПК изолятами *A. flavus* оказалось гораздо слабее.

## 2. Токсинообразующая способность изолятов грибов рода *Aspergillus*, выделенных из зерновых кормов на суловом агаре (СА), агаре Чапека-Докса (ЧДА) и увлажненном зерне риса (ЗР) (23 °С, 7 сут)

Вид гриба (число изолятов)	Микотоксин	Количество микотоксина, $\bar{X} \pm s$ нг/г субстрата		
		СА	ЧДА	ЗР
<i>A. flavus</i> (6)	ЦПК	125±28	1410±280	900±165
		200±80	1780±40	1710±200
		330±55	1190±110	1055±270
		—	93±15	205±83
		200±45	945±245	780±195
<i>A. pseudoglaucus</i> (2)	МФК	260±78	810±155	1115±180
		не опр.	970±69	1425±95
		не опр.	775±46	1040±56
<i>A. repens</i> (3)	МФК	не опр.	975±155	1145±150
		не опр.	1060±145	1560±190
		не опр.	2560±335	3005±920
		не опр.		

Примечание. ЦПК — циклопиазоновая кислота, МФК — микрофеноловая кислота;  $\bar{X}$  — среднее арифметическое значение,  $s$  — ошибка выборочной средней. Прочерк означает, что микотоксин не обнаружен, не опр. — определение микотоксина не проводилось.

Учитывая различия в метаболическом ответе грибов на СА, последующее тестирование изолятов из сена и соломы мы проводили на двух питательных средах — СА и ЗР (табл. 3), ранее использованном для грибов рода *Fusarium* из тех же объектов (9). В число анализируемых микотоксинов были введены АВ<sub>1</sub>, СТЕ, ОА, ЭА, продуцированию которых грибами *Aspergillus* посвящено большое число работ (35), изученные в меньшей степени МФК, ЦПК и ЭМО (29-32), а также ФУМ и ДОН, найденные у отдельных штаммов этих грибов (33, 34). Из 5 распространенных видов, а также *A. nidulans* было выбрано по 3-4 культуры, для встречающихся реже — все полученные изоляты (от 1 до 5). У *A. candidus* и *A. niger*, выделенных из кормов и входящих в группу патогенных, способность к образованию анализируемых микотоксинов не была обнаружена, поэтому их не включили в дальнейшее исследование.

дование. Выбор двух ростовых сред для тестирования токсинообразования грибов оказался удачным. На ЗР происходило более активное накопление большинства микотоксинов — СТЕ (*A. versicolor*, *A. nidulans*), ЦПК (*A. tamarii*, у всех 5 изолятов продуцирование удалось выявить только на этом субстрате) и ЭМО (*A. sydowii*). Напротив, для биосинтеза МФК у *A. pseudoglaucus* и *A. repens* предпочтительнее оказался СА. По результатам оценки грибов *Aspergillus* относительная ошибка выборочной средней при 3-кратной повторности в посевах на СА и ЗР не превышала 20 % и была вполне приемлемой.

### 3. Токсинообразующая способность изолятов грибов рода *Aspergillus*, выделенных из грубых кормов на суловом агаре (СА) и увлажненном зерне риса (ЗР) (23 °С, 7 сут)

Вид гриба (n)	Микотоксин (n <sup>+</sup> )	Количество микотоксина, X±s нг/г субстрата	
		СА	ЗР
<i>A. versicolor</i> (3)	СТЕ (3)	1060±150	197860±30560
		160±32	41620±6520
		4050±810	223960±43310
<i>A. pseudoglaucus</i> (4)	МФК (4)	30320±5620	21730±4340
		1750±130	685±44
		1840±45	630±75
		2200±310	940±22
<i>A. wentii</i> (3)	МФК (1)	123±22	—
<i>A. nidulans</i> (3)	СТЕ (3)	—	21460±4200
		—	9480±1830
		—	13570±2330
<i>A. tamarii</i> (5)	ЦПК (5)	—	3410±680
		—	1920±255
		—	1370±105
		—	2780±550
		—	1760±270
<i>A. sydowii</i> (3)	ЭМО (2)	—	120±18
		—	245±45
<i>A. repens</i> (2)	МФК (2)	1020±42	480±27
		810±98	595±80

Примечание. СТЕ — стеригматоцистин, ЦПК — циклопиазоновая кислота, МФК — микофеноловая кислота, ЭМО — эмодин; n — число исследованных изолятов, n<sup>+</sup> — число изолятов-продуцентов; X — среднее арифметическое значение, s — ошибка выборочной средней. Прочерки означают, что микотоксин не обнаружен.

Проведенные исследования показали, что выделенный из грубых кормов комплекс грибов рода *Aspergillus*, включающий 7 видов, способен к биосинтезу СТЕ, ЦПК и МФК. Продуцентами ЦПК были оба представителя группы *A. flavus* (*A. flavus*, *A. tamarii*), СТЕ — *A. versicolor* и *A. nidulans*, МФК — *A. pseudoglaucus*, *A. repens* и *A. wentii*. При микотоксикологическом анализе сена и соломы из тех же регионов выявлена обширная контаминация СТЕ, МФК, ЦПК и ЭМО со случаями накопления значительных количеств (7, 8). Возможный источник контаминации кормов ЭМО среди грибов рода *Aspergillus* найти не удалось. Только два из трех изолятов *A. sydowii* продуцировали его в малых количествах 120±20 и 245±40 нг/г. *A. fumigatus*, в составе метаболома которого описаны ЭА и ЭМО (36), был представлен единственным изолятом, не способным к образованию ЭМО и продуцирующим ЭА в количестве 220±32 нг/г. ОА, ФУМ и ДОН в образцах мицелиально-споровой биомассы грибов обнаружены не были. АВ<sub>1</sub> сопутствовал СТЕ у двух изолятов *A. versicolor*, выращенных на ЗР, в следовых концентрациях 15±3 и 14±1 нг/г. Представители распространенных в кормах видов *A. amstelodami* и *A. ochraceus*, а также редко встречающихся *A. terreus* и *A. chevalieri* не образовывали ни один из изученных микотоксинов в количествах, превышающих десятки нг/г субстрата.

Признавая возможность участия в контаминации этих кормов токсинопродуцирующих видов *Aspergillus*, нельзя не отметить, что по принятым критериям (37) они в основном относятся к слабым продуцентам — накопление токсинов даже в наиболее благоприятных условиях не достига-

ло 10000 нг/г субстрата у всех изолятов *A. pseudoglaucus* и *A. nidulans* и было на порядок ниже у *A. flavus* и *A. tamarii*. Только один из часто встречающихся видов, *A. versicolor*, проявил себя в экспериментах как высокоактивный продуцент СТЕ при культивировании на ЗР. Возможно, к контаминации кормов этими же токсинами имеют отношение грибы другой систематической принадлежности, в частности из рода *Penicillium*. В предыдущих исследованиях были получены указания на то, что многие токсины способны образовывать не только представители *Aspergillus*, но и грибы других родов (38, 39), поэтому в свете современных представлений понятие «аспергиллотоксины» становится все более условным. Развитие геномного анализа показывает, что кластеры, кодирующие биосинтез какого-либо конкретного микотоксина, действительно встречаются у грибов генетически удаленных групп (33).

В настоящей работе получены сведения о способности грибов *Aspergillus* из микобиоты грубых кормов к токсинообразованию, хоть и не всегда значительной. Тем не менее, вполне возможно, что реализация их потенциала могла приобретать другую интенсивность не только *in vivo* в процессе вегетации трав, но и после скашивания, высушивания и хранения корма. Изучение причин резких смещений метаболического профиля у грибов под влиянием условий обитания, отмеченных для отдельных санитарно значимых видов, в частности для *Fusarium graminearum* Schw., остается важным направлением научного поиска.

Таким образом, для 7 видов рода *Aspergillus* получено подтверждение возможности участия в обширной загрязненности кормов циклопиазоновой кислотой, стеригматоцистином и микофеноловой кислотой со случаями накопления значительных количеств. Однако источники контаминации другими токсинами, в частности эмодином, охратоксином А, эргоалкалоидами, вполне могли быть среди представителей остальных идентифицированных видов, а также среди тех, видовая принадлежность которых не была установлена. Из-за малого числа доступных изолятов нам вряд ли удалось в полной мере оценить токсинообразующую способность *A. tamarii*, *A. sydowii*, *A. fumigatus*, а также *A. terreus* и *A. chevalieri*. Вполне возможно, что для *A. amstelodami* и *A. ochraceus* выбранные субстраты оказались не вполне подходящими для индуцирования процессов токсинообразования. В этой связи в дальнейшем целесообразно расширить поиск носителей токсичности среди этих видов *Aspergillus* и других микромицетов из состава микобиоты грубых кормов, а также продолжить эксперименты с тестированием на разных средах для исчерпывающей оценки потенциала грибов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Steinbach W.J., Perfect J.R., Schell W.A., Walsh T.J., Benjamin D.K. In vitro analyses, animal models, and 60 clinical cases of invasive *Aspergillus terreus* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48(9): 3217-3225 (doi: 10.1128/AAC.48.9.3217-3225.2004).
2. Sajid M.A., Khan I.A., Rauf U. *Aspergillus fumigatus* in commercial poultry flocks, a serious threat to poultry industry in Pakistan. *J. Anim. Plant Sci.*, 2006, 16 (3-4): 79-81.
3. Хмелевский Б.Н., Пилипец В.И., Малиновская Л.С., Костин В.В., Комарницкая Н.П., Иванов В.Г. Профилактика микотоксикозов животных. М., 1985.
4. Gallo A., Giuberti G., Frisvad J.C., Bertuzzi T., Nielsen K.F. Review on mycotoxin issues in ruminants: occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. *Toxins*, 2015, 7: 3057-3111 (doi: 10.3390/toxins7083057).
5. Greco M., Kemppainen M., Pose G., Pardo A. Taxonomic characterization and secondary metabolite profiling of *Aspergillus* Section *Aspergillus* contaminating feeds and feedstuffs. *Toxins*, 2015, 7: 3512-3537 (doi: 10.3390/toxins7093512).
6. Abeer H., Abd-Allah E.F. Antifungal potential of propolis against carcinogenic citrinin produced by *Aspergillus terreus* Thom. *J. Pure Appl. Microbio.*, 2014, 8(5): 3937-3943.
7. Кононенко Г.П., Буркин А.А. О контаминации микотоксинами партий сена в животноводческих хозяйствах. *Сельскохозяйственная биология*, 2014, 4: 120-126 (doi:

- 10.15389/agrobiology.2014.4.120rus).
8. Кононенко Г.П., Буркин А.А. Микотоксикологический анализ травяных кормов. Успехи медицинской микологии, 2014, 13: 305-306.
  9. Piryazeva E.A., Kononenko G.P., Burkin A.A. Affection of coarse fodders by toxigenic *Fusarium* fungi. Agricultural Biology, 2016, 51(6): 937-945 (doi: 10.15389/agrobiology.2016.6.937eng).
  10. Raper K.B., Fennell D.J. The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1965.
  11. Burkin A.A., Kononenko G.P. Mycotoxin contamination of meadow grasses in European Russia. Agricultural Biology, 2015, 50(4): 503-512 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.4.503eng).
  12. Лычагин Г.Я. О токсических грибах, выделенных из сена в Рязанской области. Сборник научных трудов Рязанского СХИ, 1970, 24(2): 56-60.
  13. Назыпов М.Н. Видовой состав и токсичные свойства микофлоры лугового сена и сеяных трав. Ученые записки Казанского ветеринарного института, 1970, 104: 180-183.
  14. Тремасов М.Я., Иванов А.В., Сергейчев А.И., Титова В.Ю., Петрова Н.В. Мониторинг микроскопических грибов и микотоксинов в Республике Татарстан. Мат. Межд. симп. «Агроэкологическая безопасность в условиях техногенеза». Казань, 2006, ч. 1: 358-362.
  15. Салихова Н.М. Распространение токсических грибов на грубых кормах Дагестанской АССР. Труды ВНИИВС, 1973, 47: 43-46.
  16. Калоев С.С. Количественный состав микроскопических грибов, поражающих грубые корма в Северной Осетии. Труды Кубанского сельскохозяйственного института, 1975, 97(125): 3-7.
  17. Макаров Ю.А., Горковенко Н.Е. Эколого-микологическая оценка растительных кормов Приамурья. Дальневосточный аграрный вестник, 2010, 4(16): 32-34.
  18. Старченко Л.Е. Токсичные грибы на грубых кормах и их микологический контроль в условиях Львовской области. Автореф. канд. дис. Львов. 1967.
  19. Иванов А.Т. Санитарно-микологические исследования бобовых культур в условиях Белорусской ССР. Автореф. канд. дис. М., 1967.
  20. Плауска В.А., Густас А.П. Микотоксикологические исследования грубых кормов и зернофуража Литовской ССР. Труды Литовского НИИ ветеринарии, 1969, 3: 118-125.
  21. Лугина Ж.А. Изучение распространенности токсигенных грибов на кормах в условиях Армянской ССР. Труды ВНИИВС, 1970, 35: 73-79.
  22. Лугина Ж.А., Харатьян А.М. Зараженность кормов грибами родов *Aspergillus* и *Fusarium*. Известия сельскохозяйственных наук, 1985, 1: 79-85.
  23. Жаханов А. Микотоксикологическая характеристика грубых кормов и особенности токсинообразования гриба *Fusarium sporotrichioides* Sherb. на юге Казахстана. Автореф. канд. дис. Алма-Ата, 1975.
  24. Ибрагимов Р.Г. Микофлора зернофуража и вегетируемых кормовых злаков в южной части Большого Кавказа Азербайджана и их токсикологическая характеристика. Автореф. канд. дис. Киев, 1980.
  25. Азимов И.М., Аскеров Д.А., Ибрагимов Р.Г., Габиев М.М. Микофлора кормов в Азербайджанской ССР и ее токсигенные представители. В сб.: Труды Азербайджанского научно-исследовательского ветеринарного института: Инфекционные и паразитарные болезни животных в Азербайджане. Баку, 1984, 30: 96-100.
  26. Lu P., Zhao X., Cui T. Production of emodin from *Aspergillus ochraceus* at preparative scale. Afr. J. Biotechnol., 2010, 9(4): 512-517.
  27. Eroshkin A.A., Soboleva N.A., Burkin A.A., Kononenko G.P. Грибы-продуценты охратоксина А в зерновых кормах. В сб.: Проблемы ветеринарной санитарии и экологии. М., 2000, т. 109: 134-144.
  28. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Кислякова О.С. Актуальность изучения проблемы охратоксикоза в России. Успехи медицинской микологии, 2003, 1: 122-124.
  29. Кононенко Г.П., Буркин А.А. Эмодин: контаминация зерновых кормов. Успехи медицинской микологии, 2007, 9: 88-89.
  30. Буркин А.А., Пирязева Е.А., Кононенко Г.П., Малиновская Л.С. Циклопиазоновая кислота: продуценты из рода *Aspergillus* Mich. Ex Lk. в составе микобиоты кормов. Успехи медицинской микологии, 2006, 7: 94-95.
  31. Кононенко Г.П., Буркин А.А. Токсинообразующая способность грибов рода *Aspergillus* и оценка загрязненности циклопиазоновой кислотой кормовой продукции. Микология и фитопатология, 2008, 42(2): 178-184.
  32. Burkin A.A., Kononenko G.P. Producers of mycophenolic acid in ensiled and grain feeds. Appl. Biochem. Microbiol., 2010, (46)5: 545-550 (doi: 10.1134/S0003683810050145).
  33. Frisvad J.C., Smedsgaard J., Samson R.A., Larsen T.O., Thrane U. Fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger*. J. Agric. Food Chem., 2007, 55(23): 9727-9732.
  34. Firouzmand R., Modiri L., Nosrati A.C. Deoxynivalenol production by *Aspergillus* spp. LAP Lambert Academic Publishing, Germany, Saarbrücken, 2013.
  35. Weidenbörner M. Encyclopedia of food mycotoxins. Springer, Berlin—Heidelberg—NY, 2001.
  36. Frisvad J.C., Rank C., Nielsen K.F., Larsen T.O. Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. Med. Mycol., 2008, 47: S1-S19 (doi: 10.1080/13693780802307720).
  37. Кононенко Г.П., Буркин А.А. Совершенствование методологии оценки токсинообразования у микроскопических грибов. Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2010, 1: 195-196.

38. Vinokurova N.G., Ivanushkina N.E., Khmel'nitskaya I.I., Arinbasarov M.U. Synthesis of  $\alpha$ -cyclopiazonic acid by fungi of the genus *Aspergillus*. Appl. Biochem. Microbiol., 2007, 43(4): 486-489 (doi: 10.1134/S0003683807040138).
39. Кононенко Г.П., Буркин А.А. Микофеноловая кислота: распространение в биологических объектах. Современная микология в России, 2015, 4(2): 201-203.

ФГБНУ Всероссийский НИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии,

123022 Россия, г. Москва, Звенигородское ш., 5,  
e-mail: kononenkogp@mail.ru

Поступила в редакцию  
14 февраля 2017 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2017, V. 52, № 6, pp. 1279-1286

## SPECIES COMPOSITION AND TOXICOLOGICAL CHARACTERISTICS OF FUNGI OF THE GENUS *Aspergillus* ISOLATED FROM COARSE FODDERS

G.P. Kononenko, E.A. Piryazeva, E.V. Zotova, A.A. Burkin

All-Russian Research Institute of Sanitary, Hygiene and Ecology, Federal Agency of Scientific Organizations, 5, Zvenigorodskoe sh., Moscow, 123022 Russia, e-mail kononenkogp@mail.ru (corresponding author)

ORCID:

Kononenko G.P. orcid.org/0000-0002-9144-615X

Piryazeva E.A. orcid.org/0000-0001-5443-3213

Zotova E.V. orcid.org/0000-0002-1479-8602

Burkin A.A. orcid.org/0000-0002-5674-2818

The authors declare no conflict of interests

Received February 14, 2017

doi: 10.15389/agrobiology.2017.6.1279eng

### Abstract

The problem of ensuring the safety of coarse fodders, which annually replenishes the Russian feed production on a large scale, raises concern about the multiple combined contamination with mycotoxins and the extensive spread of toxigenic fungi. Recently, it has been established that *F. sporotrichioides* plays a dominant role among fusarium fungi in these fodders, producing metabolites, the T-2 toxin and diacetoxyscirpenol, which can cause acute poisoning in animals. The purpose of this work, which became the next stage in the study of the main toxin-producing micromycetes of coarse fodders, was the determination of the species composition, occurrence and toxin production in fungi of the genus *Aspergillus* under experimental conditions favourable for the fullest realization of their potential. The objects of mycological analysis were 258 average samples from the production batches of hay and straw harvested in the livestock farms of Bryansk (2011) and Moscow (2013) regions. Isolates with established species affiliation were cultivated on Czapek-Dox agar (CDA), wort agar (WA) and moistened rice grain (RG) for 7 days at 23 °C. The content of sterigmatocystin (STE), emodin (EMO), aflatoxin B<sub>1</sub> (AB<sub>1</sub>), ochratoxin A (OA), mycophenolic acid (MPA), cyclopiazonic acid (CPA), ergot alkaloids (EA), deoxynivalenol (DON) and fumonisins (FUM) in extracts of mycelial spore biomass were determined by enzyme immunoassay with certified test systems. To assess the toxin production, 32 isolates of 12 species of *Aspergillus* fungi of hay and straw were used, as well as 27 isolates of *A. flavus* Link, *A. pseudoglaucus* Blochwitz, *A. repens* de Bary isolated earlier from grain fodders. Fungi of the genus *Aspergillus* were found in samples with a frequency of 62.0 % and an infection rate of 1.7-100 %. The obtained isolates belonged to 15 species included in 10 taxonomic groups with the largest species diversity in the *A. glaucus* group (4 species). The most common species were *A. flavus* and *A. niger* van Tieghem (more than 50.0 % of the contaminated samples), followed by *A. versicolor* (Vuill.) Tiraboschi, *A. pseudoglaucus*, *A. amstelodami* (Mangin) Thom & Church, *A. ochraceus* Wilhelm and *A. wentii* Vehmer (10.6-18.8 %), *A. nidulans* Eidam (6.3 %), the remaining 7 species — *A. candidus* Link, *A. tamaris* Kita, *A. sydowii* (Bain. & Sart.) Thom & Church, *A. fumigatus* Fresenius, *A. repens*, *A. terreus* Thom, *A. chevalieri* (Mangin) Thom & Church were less common (< 5 %). The intensity of formation of the CPA (*A. flavus*) and MPA (*A. pseudoglaucus*, *A. repens*) was quite comparable in the CDA and RG. Compared to WA, a greater accumulation of the majority of mycotoxins occurred in the RG, i.e. STE (*A. versicolor*, *A. nidulans*), CPA (*A. flavus*, in all 5 *A. tamaris* isolates CPA could be detected only on this substrate) and EMO (*A. sydowii*). For the biosynthesis of MPA in *A. pseudoglaucus* and *A. repens*, WA was preferred. Testing of fungi on three nutrient media allows us to establish that a complex of *Aspergillus* fungi which includes 7 species can be associated with the contamination of coarse fodders with STE, CPA and MPA; the source of EMO contamination among the fungi of the genus *Aspergillus* was not found. Only two of the three isolates of *A. sydowii* produced it in small amounts of 120±20 and 245±40 ng/g. The remaining mycotoxins analyzed in the isolates were not detected. The possibility of participation of fungi of other systematic groups in the contamination of fodder with STE, CPA, MPA and EMO is discussed, whereas clusters encoding the biosynthesis of mycotoxins have been found in micromycetes from genetically distinct groups in recent years.

Keywords: hay, straw, fungi of the genus *Aspergillus*, mycotoxins.