

Микология и фитопатология

УДК 636.085.19:636.086.1/.3:632.4

doi: 10.15389/agrobiol.2024.3.550rus

ПРОДУЦИРОВАНИЕ ОХРАТОКСИНА А, ФУМОНИЗИНОВ И ЭМОДИНА У ВИДА *Aspergillus niger* ИЗ КОРМОВОЙ ПРОДУКЦИИ*Г.П. КОНОНЕНКО , Е.А. ПИРЯЗЕВА, А.А. БУРКИН, Е.В. ЗОТОВА

Микромицеты одного из самых сложных в таксономическом отношении комплекса *Aspergillus niger* (the *A. niger* “aggregate”) в последние десятилетия неизменно остаются объектом пристального внимания исследователей в связи с рисками негативных воздействий на человека и животных. Для индустриальных и коллекционных штаммов установлена способность синтезировать токсичные метаболиты с особо опасными формами действия — охратоксин А (M.L. Abarca с соавт., 1994; J. Téreп с соавт., 1996; J. Varga с соавт., 2002), фумонизины группы В (J.C. Frisvad с соавт., 2007; J.M. Mogensen с соавт., 2010; M. Mensson с соавт., 2010) и эмодин (A.A. Ismaiel с соавт. 2016). Природные штаммы, продуцирующие охратоксин А и фумонизины, выявлены в продовольствии (P. Noomin с соавт., 2009; M. Storari с соавт., 2012; M. Yanai с соавт., 2013) и в кормовой продукции (A. Dalcerо с соавт., 2002; F. Accensi с соавт., 2004). В России приоритет в изучении был отдан рискам распространения этих грибов как возбудителей микозов в среде обитания человека (А.Б. Кулько, 2012; О.Е. Марфенина с соавт., 2014). В настоящей работе для культур *A. niger* из отечественной кормовой зернопродукции и консервированных травяных кормов впервые установлен характер продуцирования фумонизинов (ФУМ), охратоксина А (ОА) и эмодина (ЭМО), показано влияние типа субстрата на интенсивность токсинообразования *in vitro*, и подтверждена принадлежность штаммов виду *A. niger* в составе *A. niger* “aggregate”. Цель работы — оценка способности культур *Aspergillus niger*, выделенных из комбикорма, пяти видов комбикормового сырья и сена разного ботанического состава и территориального происхождения, продуцировать фумонизины группы В, охратоксин А и эмодин, а также уточнение их видовой принадлежности по совокупности морфологических, физиологических характеристик и составу метаболитов. Для 12 моноконидиальных культур токсинообразование оценивали на сахарозном агаре с дрожжевым экстрактом (YES), агаре Чапека с экстрактом автолизата дрожжей и 20 % сахарозы (CYA20S) и на зерне риса. После инкубирования (7 сут, 25 °С) анализ экстрактов выполняли с помощью тест-систем для иммуноферментного определения микотоксинов (СТО ВНИИВСГЭ, Россия). По морфологическим критериям (диаметр колоний, характер роста, цвет, консистенция колоний, форма и ширина растущего края, форма конидиальной головки, структура и пигментация конидиеносцев, размеры, форма и цвет везикулы, метул, фиалид и конидий), по отсутствию склероциев, результату теста Эрлиха и способности продуцировать ОА и ФУМ подтверждена принадлежность культур виду *A. niger* в кладе двухъярусных видов (R.A. Samson с соавт., 2007; J. Varga с соавт. 2011). Накопление ФУМ у 7 штаммов составляло 0,2 до 630 мкг/г и у 5 отсутствовало, все штаммы продуцировали ОА (от 0,005 до 0,064 мкг/г) и ЭМО (от 0,004 до 0,9 мкг/г). Различия в накоплении микотоксинов на агаровых средах и зерновом субстрате подтвердило влияние компонентов субстратов на активность детерминирующих кластеров генов. Из-за слабого потенциала продуцирования ОА, ЭМО и небольшой доли активных продуцентов ФУМ вклад *A. niger* в контаминацию зерновых кормов и сена (даже при интенсивной пораженности) вряд ли может быть существенным.

Ключевые слова: *Aspergillus niger*, комбикормовое сырье, комбикорма, сено, фумонизины группы В, охратоксин А, эмодин, иммуноферментный анализ.

Повышенное внимание мировой науки к грибам *Aspergillus* секции *Nigri*, известным как «черные аспергиллы», объясняется их широкой распространенностью, традиционным применением в биотехнологических и пищевых отраслях и данными, подтверждающими их участие в процессах патогенеза и продуцирования токсичных метаболитов (1, 2). В России приоритет в изучении был отдан рискам распространения этих грибов как возбудителей микозов в среде обитания человека (3, 4).

Развитие генетики и молекулярной биологии уже в начале 1990-х годов указывало на целесообразность обособления комплекса *A. niger* (the *A. niger* “aggregate”) (5, 6), затем для его структуризации было предложено

*Работа выполнена в соответствии с Государственным заданием по теме: FGUG-2022-0008 «Научно обосновать и разработать новые методы, средства и технологии обеспечения устойчивого ветеринарно-санитарного благополучия животноводства». Регистрационный номер НИОКТР в ЦИТИС 122042700106-1.

несколько подходов (7, 8), и уточнение таксономических рангов продолжится (9). У единичных природных и коллекционных штаммов выявлена способность продуцировать охратоксин А (ОА) (10-12), фумонизин В₂ (ФВ₂), фумонизин В₆ (ФВ₆) (13, 14) и токсин антрахинонового ряда — эмодин (ЭМО) (15, 16). Продукенты ОА, ФВ₂ и его аналогов найдены в составе популяций грибов из продовольственных объектов во многих странах — Италии (17), Таиланде (18), Швейцарии (19), Португалии (20), Бразилии (21), Японии (22, 23), Испании (24) и Словении (25). Гораздо меньше сведений о токсинообразовании получено для грибов, участвующих в контаминации кормов: биосинтез ОА подтвержден в Испании у изолятов из кормосмеси для бройлеров и соевых бобов (10), смесевых кормов и сырья (26), в Аргентине — из комбикормов для птицы, свиней и кроликов (27). По данным российских исследователей, *A. niger*, идентифицированный по таксономической системе (28), встречается в комбикормовом сырье и комбикормах (29) и в консервированных травяных кормах (30). У части изолятов *in vitro* (сусловый агар, 7 сут, 25 °С) методом иммуноферментного анализа было выявлено продуцирование фумонизинов группы В (ФУМ) (у 5 из 14, 0,01-3,2 мкг/г), ОА (у 1 из 21, 0,03 мкг/г) и ЭМО (у 15 из 21, 0,007-0,075 мкг/г) (неопубликованные данные авторов).

В настоящей работе для культур *A. niger* из отечественной кормовой зернопродукции и консервированных травяных кормов впервые установлен характер продуцирования ФУМ, ОА и ЭМО, показано влияние типа субстрата на интенсивность токсинообразования *in vitro*, и подтверждена принадлежность штаммов виду *A. niger* в составе *A. niger* “aggregate”.

Цель работы — оценка способности культур *Aspergillus niger*, выделенных из комбикорма, пяти видов комбикормового сырья и сена разного ботанического состава и территориального происхождения, продуцировать фумонизины группы В, охратоксин А и эмодин, а также уточнение их видовой принадлежности по совокупности морфологических, физиологических характеристик и составу метаболитов.

Методика. Объектом исследования были 12 культур грибов, выделенных из кормов с 2005 по 2023 год и отнесенных к виду *A. niger* (28). В работе использовали питательные среды — агар Чапека-Докса (Czapek Dox agar, CDA) (28), агар Чапека с дрожжевым экстрактом (Czapek yeast extract agar, CYA), сахарозный агар с дрожжевым экстрактом (yeast extract sucrose agar, YES), агар Чапека с экстрактом автолизата дрожжей и 20 % сахарозы (Czapek yeast extract agar with 20 % sucrose, CYA20S), приготовленные по рецептурам (31), и солодовый агар (malt extract agar, MEA) («Liofilchem S.r.l.», Италия). Для получения моноконициальных культур по 3-4 капли суспензии конидий в стерильном 0,1 % растворе Twin 80 (не более двух конидий в капле бактериологической петли диаметром 0,4 см) с помощью той же петли переносили на дно чашки Петри и заливали тонким слоем осветленного CDA, расплавленного и охлажденного до 35 °С. Через 1 сут культивирования при 23-25 °С под микроскопом (Eclipse E200, «Nikon», Япония) отмечали проросшие конидии, находящиеся друг от друга на достаточном расстоянии, и переносили их с кусочком агара в пробирки со скошенным CDA. После культивирования при комнатной температуре в течение 7-10 сут подтверждали их чистоту.

Для описания морфологических признаков штаммы высевали в трех равноудаленных точках на CDA в чашках Петри диаметром 90 мм, культивировали при 25 °С в течение 7-14 сут. Макроморфологические характеристики (диаметр колоний, характер роста, цвет, консистенцию колоний, форму и ширину растущего края, наличие склероциев) описывали на месте

роста. Способность культур образовывать склероции оценивали также на двух средах — СУА (25 °С, 7 сут) (32) и МЕА (30 °С, 7 сут) (33) с размещением на поверхности нескольких предварительно простерилизованных сухих ягод темного винограда. Микроморфологические признаки (форму конидиальной головки, структуру и пигментацию конидиеносцев, размеры, форму и цвет везикулы, метул, фиалид и конидий) определяли с помощью малого ($\times 10$) и среднего ($\times 40$) увеличений микроскопа на препаратах, приготовленных методом раздавленной капли. Для фиксации использовали лактофенол Аммана (смесь 20 г фенола, 20 мл 40 % молочной кислоты, 40 мл глицерина и 20 мл дистиллированной воды), для смачивания и удаления избытка конидий — обработку 70 % этиловым спиртом в течение 30 с. Тест Эрлиха выполняли по процедуре А. Logriego с соавт. (7). Штаммы выращивали на 20 мл СУА в чашках Петри при 25 °С от 5 до 9 сут. Фрагмент фильтровальной бумаги 2,5 \times 2,5 см, пропитанный смесью 2 % раствора 4-диметиламинобензальдегида в этаноле и 10 N водного раствора HCl в объемном соотношении 85:15, помещали на поверхность участка (1 \times 1 см), вырезанного из центра колонии гриба, и в течение 15 мин наблюдали за изменением окрашивания бумаги.

При оценке токсинообразования штаммы культивировали на YES, СУА20S и зерне риса. Инокулюм (фрагмент 10-суточной культуры на CDA) в трех повторностях помещали во флаконы вместимостью 10 мл с диаметром дна около 18 мм, каждый из которых содержал по 1,5 мл агаровых сред или по 1,0 г зерна риса с добавлением 1,0 мл воды перед стерилизацией. Флаконы закрывали ватно-марлевыми пробками и обертывали слоем лабораторной пленки (Parafilm "M"® PM-996, «Pechiney Plastic Packaging», США). После инкубирования в темноте в течение 7 сут при 25 °С в каждый флакон добавляли по 1,5 или 3,0 мл (для зернового субстрата) смеси ацетонитрила и воды в объемном соотношении 84:16 и интенсивно встряхивали в начале и конце стационарной 14-часовой экстракции. Анализ экстрактов выполняли с помощью коммерческих тест-систем для иммуноферментного определения ФУМ, ОА и ЭМО (СТО ВНИИВСГЭ, Россия). При начальном 10-кратном разведении экстрактов фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7,5) пределы детектирования составили на агаровых средах 0,0008 мкг/г (ОА), 0,01 мкг/г (ФУМ) и 0,004 мкг/г (ЭМО), на зерновом субстрате — 0,0024 мкг/г (ОА), 0,03 мкг/г (ФУМ) и 0,012 мкг/г (ЭМО).

Данные обрабатывали с помощью описательной статистики в программе Microsoft Excel 2013, результаты выражали как средние арифметические полученных значений (M) с ошибкой выборочной средней ($\pm SEM$).

Результаты. Исходные изоляты, идентифицированные как *A. niger* (28), были получены из комбикорма, пяти видов комбикормового сырья и сена разного ботанического состава и территориального происхождения (табл. 1).

1. Характеристика исходных изолятов *Aspergillus niger*, использованных в работе

Объект (число изолятов)	Территория	Регистрационный № изолятов
Комбикормовое сырье (6):		
горох	Липецкая область	43/6
зерно пшеницы	Ставропольский край	116/4
шрот соевый	Алтайский край	81/8
жмых рапсовый	Липецкая область	465/1, 466/1
мясокостная мука	Курская область (птицефабрика)	79/3
Комбикорм (1)	Московская область	462
Сено (5)		
	Брянская область	309/4, 314/3
	Тверская область	781/5
	Вологодская область	802/1
	Московская область	803/4

Процедура оценки потенциала токсинообразования, ранее примененная для грибов *Aspergillus* (34), включала посе́вы во флаконы с малой площадью поверхности сред (около 2,5 см²), 7 сут культивирования без освещения при 25 °С и иммуноферментный анализ экстрактов биомассы. Выбор агаровых сред СYA20S, YES и зернового субстрата (рис) был обусловлен их частым использованием в экспериментах с грибами *A. niger* “aggregate” (20, 35, 36). В образцах биомассы штаммов содержание ОА и ЭМО определяли избирательно, а ФУМ — суммарно в связи с групповой специфичностью тест-системы: перекрестная реактивность составляла в отношении ФВ₂ 126 %, ФВ₁ — 100 % и ФВ₃ — 117 % (37). В составе метаболитов *A. niger*, кроме ФВ₂, ФВ₁ и ФВ₃ (38), известны также аналоги ФВ₄ (18, 39) и ФВ₆ (14, 19), однако данными по степени их узнавания разработчики не располагали.

2. Продуцирование (мкг/г субстрата) фумонизинов группы В (ФУМ), ократоксина А (ОА) и эмодина (ЭМО) моноконидиальными культурами *Aspergillus niger*, выделенными из кормов, на агаровых средах и зерне риса (7 сут, 25 °С, без освещения) (n = 3, M±SEM)

Штамм, регистрационный №	Субстрат		
	СYA20S	YES	рис
	Ф У М		
43/6	—	—	—
79/3	37±6	205±27	630±128
81/8	0,2±0,1	—	—
116/4	—	—	—
462	103±9	198±2	547±127
465/1	8,0±3,0	0,6±0,2	1,0±0,1
466/1	160±11	146±9	73±7
309/4	—	—	—
314/3	—	—	—
781/5	—	—	—
802/1	166±7	103±6	19±6
803/4	105±7	62±3	17±2
	О А		
43/6	0,008±0,000	0,008±0,000	—
79/3	0,064±0,006	0,010±0,000	0,020±0,001
81/8	0,011±0,001	—	—
116/4	0,005±0,000	0,015±0,000	—
462	0,012±0,000	0,007±0,001	—
465/1	0,010±0,000	0,007±0,001	—
466/1	0,011±0,001	0,011±0,005	—
309/4	0,011±0,002	0,005±0,001	—
314/3	0,013±0,002	0,008±0,000	—
781/5	0,013±0,002	0,007±0,001	—
802/1	0,009±0,001	—	—
803/4	0,011±0,002	0,019±0,001	0,024±0,003
	Э М О		
43/6	0,004±0,001	0,009±0,000	—
79/3	0,005±0,001	0,008±0,001	—
81/8	0,010±0,002	0,020±0,003	0,030±0,009
116/4	0,300±0,080	0,010±0,003	0,900±0,200
462	—	0,005±0,000	0,020±0,006
465/1	—	0,005±0,000	—
466/1	—	0,004±0,000	0,600±0,100
309/4	0,030±0,006	0,030±0,050	—
314/3	0,300±0,050	0,008±0,000	—
781/5	0,030±0,050	0,010±0,002	—
802/1	—	0,006±0,002	0,015±0,000
803/4	0,005±0,000	0,004±0,000	0,500±0,100

Примечание. СYA20S — агар Чапека с экстрактом автолизата дрожжей и 20 % сахарозы (Szarek yeast extract agar with 20 % sucrose), YES — сахарозный агар с дрожжевым экстрактом (yeast extract sucrose agar). Прочерки означают, что ФУМ, ОА или ЭМО не обнаружены.

В нашей работе ФУМ продуцировали 7 штаммов из 12 в количествах от 0,2 до 630 мкг/г, а у 5 штаммов ФУМ не были выявлены ни на одной из сред (табл. 2). В целом, способность к биосинтезу ФУМ сохранялась у штаммов при незначительных колебаниях содержаний на всех испытанных

средах. Высокоактивные продуценты с накоплением, превышающим 10 мкг/г, были выделены из зернопродукции (№№ 79/3, 462, 466/1) и сена (№№ 802/1, 803/4), как и непродуцирующие — соответственно №№ 43/6, 116/4 и №№ 309/1, 314/3, 781/5.

ОА был детектирован у всех штаммов, но в гораздо меньших количествах, которые удалось измерить только благодаря высокой чувствительности метода — от 0,005 мкг/г до 0,064 мкг/г (см. табл. 2). В отличие от агаровых сред, на которых ответ был получен практически у всех штаммов, в варианте с зерновым субстратом ОА был определен только у двух (см. табл. 2).

Сравнить интенсивность продуцирования ОА с данными из других источников возможно лишь с учетом неоднозначности таксономического статуса грибов, поскольку ранее, наряду с дифференциацией до вида, использовали и поливидовой ранг *A. niger* var. *niger* (40). ОА в количествах 0,02-0,03 мкг/мл был определен у штамма *A. niger* ATCC 22343 (11), у трех штаммов *A. niger* var. *niger* накопление оказалось более интенсивным — от 11,6 до 20,53 мкг/г (41). Во всех других случаях для *A. niger* var. *niger* сообщалось о меньших содержаниях ОА — 0,21, 0,36 мкг/г и 0,23, 0,59 мкг/мл (10), а также 0,013-0,025 мкг/мл (27).

ЭМО был выявлен у штаммов в количествах от 0,004 до 0,9 мкг/г, и в целом слабый ответ, как и для ОА, оказался более массовым на агаровых средах, чем на зерне (см. табл. 2).

Морфологические и физиологические свойства всех 12 протестированных культур в целом были сходными. Диаметр колоний на 8-е сут выращивания при 23-25 °С не превышал 4 см, и в начале роста часть из них (№№ 79/3, 116/4, 314/3, 466/1, 802/1, 803/4) имела глубоко погруженный желтый субстратный мицелий, на поверхности которого появлялись черные конидиальные структуры с растущим краем шириной до 0,5 см. Обратная сторона колоний была бесцветной (№№ 79/3, 81/8, 309/4, 314/3, 465/1), светло-желтой (№№ 43/6, 116/4, 466/1, 802/1, 803/4) либо бесцветной с небольшими вкраплениями желтого в центре колонии (№№ 462, 781/5). При микроскопировании препаратов наблюдали конидиальные головки — радиальные, двухъярусные, большие, конидиеносцы размером около 300×15-20 мкм с гладкими стенками, неокрашенные либо с коричневатым оттенком в верхней части ножки, везикулы шаровидные, 45-75 мкм в диаметре. Метулы присутствовали у всех штаммов и в начале споруляции в среднем имели размер 25×5,5 мкм, но встречались и более крупные, до 70×9 мкм. Размеры фиалид были в среднем 8,5×3,5 мкм, конидии — большей частью шаровидные с диаметром в среднем 3,5-4,5 мкм, темноокрашенные, толстостенные, шероховатые, с неравномерно распределенными шипами, но встречались и гладкие, особенно в начале развития. Склероции у штаммов не появились как в обычных условиях инкубации, так и на средах, рекомендованных для стимуляции процесса (32, 33). Реакция на тест Эрлиха была положительной — через 10-12 мин появлялось желтое окрашивание бумаги.

К комплексу *A. niger* причисляют 7 широко распространенных двухъярусных видов — *A. carbonarius*, *A. ibericus*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. acidus*, *A. foetidus* и *A. niger* (7). Способный образовывать склероции *A. carbonarius*, а также *A. ibericus*, отличаются от остальных размером конидий (до 7,0-9,0 мкм), у всех других остальных они меньше — от 2,5 до 5,0 мкм. *A. tubingensis* не дает окрашивания в тесте Эрлиха (7), *A. foetidus* классифицирован как синоним *A. niger* (8), и на отдельных штаммах уже продемонстрировано продуцирование ФВ₂ и аналогов (38), малых количеств ОА

(11) или его отсутствие (27, 38). *A. brasiliensis* и *A. acidus* не способны продуцировать ни ФВ₂ и его аналоги, ни ОА (39, 42, 43).

Отличия от *A. niger* криптоического вида *A. awamori* (= *A. welwitschiae*), позже введенного в состав этого комплекса (8), подтверждены молекулярными методами (8, 44, 45). Среди его метаболитов найдены ФВ₂ (24, 35, 43), ФВ₂ совместно с ФВ₄ и ФВ₆ (19), ЭМО — у штаммов *A. awamori* F12 (15) и *A. awamori* WAIR 120 (16), ОА — у *A. awamori* NRRL 3112 (11) и природных штаммов (24, 35, 46), при этом поиск других критериев для его дифференциации, в частности по накоплению ФВ₂ на разных средах (19), продолжается.

Для штаммов *A. niger*, видовая принадлежность которых установлена с помощью ПЦР (47), многократно подтвержден тот факт, что продуценты ФВ₂ представляют лишь часть выборки с широким диапазоном варьирования количества токсина. Так, ФВ₂ определен у 18 из 25 штаммов на СYA20S в количествах 0,1–41,7 мкг/г (35), у 10 из 35 штаммов на жидких тестовых средах — от 100 до 3500 мкг/г (23), у 30 из 49 штаммов (кукуруза, 30 °С, 30 сут) — от 0,002 до 0,012 мкг/г (38), у 24 из 26 штаммов (кукуруза, рис, пшеничные отруби) — от 0,002 до 70,5 мкг/г (36). В то же время ОА не был обнаружен вовсе или найден в крайне малом фоновом содержании (35, 38, 48).

Совокупность морфологических признаков, как и характер продуцирования ФУМ и ОА у 12 изученных нами штаммов (см. табл. 2), соответствовали их принадлежности виду *A. niger* в составе *A. niger* “aggregate”. Тем не менее важно отметить, что способность к биосинтезу ЭМО для представителей этого вида не была известна.

В эксперименте *in vitro* у штаммов явно прослеживались различия в реакциях на тип среды — слабо выраженная по продуцированию ФУМ и отчетливо ослабленная на зерновом субстрате в отношении ОА (см. табл. 2). У *A. niger* кластеры, регулирующие биосинтез ФВ₂ (*fum*, состоящий из 11 генов) (35, 49), ОА (*ota*, включающий гены *ota-1-ota-5*) и фактор транскрипции *bZIP* (50), функционируют независимо и находятся в разных участках генома, что, по-видимому, и объясняет наблюдаемые различия. В ряде исследований также показано влияние субстрата на интенсивность токсинообразования у *A. niger*, наряду с типом освещения (51), продолжительностью роста (36, 52), температурой и влажностью (53, 54). Так, различия в накоплении ФВ₂ выявлены на агаровых средах (53), дробленном зерне (рис, кукуруза, пшеница) (36), в накоплении ОА — на СYA с разными источниками углерода (моно- и дисахариды, крахмал) (54).

Пять культур, изолированных из зерновых и травяных кормов и не способных образовывать ФУМ ни на одной из сред (см. табл. 2), несомненно, представляют интерес как объекты будущих исследований, направленных на поиск причин, приводящих к неспособности изолятов к биосинтезу токсина. У штаммов *A. niger*, не продуцирующих ФВ₂, каких-либо изменений в биосинтетическом кластере *fum* не выявлено (35). Обнаружение культур, способных к отдельному и сочетанному продуцированию ФУМ, ОА, а также ЭМО, подтверждает внутривидовое разнообразие генетических возможностей этого вида (35) и имеет важное значение для уточнения его метаболического профиля в рамках полифазной таксономии. Учитывая широкие биосинтетические возможности *A. niger* (55), научный интерес представляет дальнейшее расширенное изучение особенностей токсинообразования у этого вида при обитании в других нишах, например в составе эндофитов (56) и в морских организмах (57).

Несмотря на ограниченный объем выборки изолятов, полученные

нами результаты позволяют дать оценку *A. niger* как возможного источника накопления микотоксинов в кормах. Учитывая слабый потенциал продуцирования ОА и ЭМО и то, что активными продуцентами ФУМ была лишь часть штаммов, вклад *A. niger* в контаминацию зерновых и травяных кормов вряд ли может оказаться существенным, даже в случаях с высокой степенью загрязненности этими микромицетами. Для зерновых кормов, микологический анализ которых ежегодно проводится в лаборатории в профилактических целях и при подозрениях на микотоксикозы, высокую пораженность *A. niger* не отмечали. Для сена интенсивное инфицирование, превышающее 50 %, отмечали в 30 % проб (Московская обл., 2013–2014 годы) (неопубликованные данные авторов), однако по результатам токсикологического мониторинга этот корм слабо контаминирован ФУМ — в количествах не более 250 мкг/кг и с частотой 8 % (58). В зеленой массе посевных кормовых культур (пшеницы, ячменя, овса, сурепицы, рапса) встречаемость ФУМ, ОА, ЭМО в целом оценена как низкая (59, 60).

Таким образом, нами подтверждена принадлежность микромицетов, участвующих в контаминации зерновых и травяных кормов, к виду *Aspergillus niger* на основании морфологических, физиологических критериев и способности к токсинообразованию. В условиях лабораторного экспресс-тестирования у 12 штаммов *A. niger* накопление фумонизинов группы В, эмодина и охратоксина А составило соответственно 0,2–630 мкг/г, 0,004–0,9 мкг/г и 0,005–0,064 мкг/г. С учетом слабого потенциала продуцирования ОА и ЭМО и того, что активными продуцентами ФУМ была лишь часть штаммов, вклад *A. niger* в контаминацию зерновых и травяных кормов оценен как малосущественный.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nielsen K.F., Morgensen J.M., Johansen M., Larsen Th.O., Frisvad J.C. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 395(5): 1225–1242 (doi: 10.1007/s00216-009-3081-5).
2. Ismail M.A. Incidence and significance of black aspergilli in agricultural commodities: a review, with a key to all species accepted to-date. *European Journal of Biological Research*, 2017, 7(3): 207–222 (doi: 10.5281/zenodo.834504).
3. Кулько А.Б. *Атлас условно-патогенных грибов рода Aspergillus — возбудителей бронхолегочных инфекций*. М., 2012.
4. Марфенина О.И., Бубнова Е.Н., Семенова Е.А., Иванова А.Е., Данилогорская А.А. Грибы рода *Aspergillus*: распространение и условия накопления в разных природных средах (на примере Европейской части России). *Микология и фитопатология*, 2014, 48(3): 139–150.
5. Varga J., Kevei F., Fekete C., Coenen A., Kozakiewicz Z., Croft J.H. Restriction fragment length polymorphisms in the mitochondrial DNAs of the *Aspergillus niger* aggregate. *Mycological Research*, 1993, 97(10): 1207–1212 (doi: 10.1016/S0953-7562(09)81286-0).
6. Debets A.J.M., Swart K., Hoekstra R.F., Bos C.J. Genetic maps of eight linkage groups of *Aspergillus niger* based on mitotic mapping. *Current Genetic*, 1993, 23: 47–53 (doi: 10.1007/BF00336749).
7. Samson R.A., Noonim P., Meijer M., Houbraken J., Frisvad J.C., Varga J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*, 2007, 59(1): 129–145 (doi: 10.3114/sim.2007.59.13).
8. Varga J., Frisvad J.C., Koksúbé S., Brankovics B., Tóth B., Sziget G., Samson R.A. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 2011, 69(1): 1–17 (doi: 10.3114/sim.2011.69.01).
9. Bian C., Kusuya Y., Sklenář F., D'hooge E., Yaguchi T., Ban S., Visagie C.M., Houbraken J., Takahashi H., Hubka V. Reducing the number of accepted in *Aspergillus* series *Nigri*. *Studies in Mycology*, 2020, 102(1): 95–132 (doi: 10.3114/sim.2022.102.03).
10. Abarca M.L., Bragulat M.R., Castella G., Cabañes F.J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(7): 2650–2652 (doi: 10.1128/aem.60.7.2650-2652.1994).
11. Téren J., Varga J., Hamari Z., Rinyo E., Kevei F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, 1996, 134(3): 171–176 (doi: 10.1007/BF00436726).
12. Ono H., Kataoka A., Koakutsu M., Tanaka K., Kawasugi S., Wakazawa M., Ueno Y., Manabe M.

- Ochratoxin A productibility by strains of *Aspergillus niger* group stored in IFO culture collection. *Mycotoxins*, 1995, 41: 47-51 (doi: 10.2520/myco1975.1995.47).
13. Frisvad J.C., Smedsgaard J., Samson R.A., Larsen T.O., Thrane U. Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(23): 9727-9732 (doi: 10.1021/jf0718906).
 14. Månsson M., Klejnstrup M.L., Phipps R.K., Nielsen K.F., Frisvad J.C., Gotfredsen C.H., Larsen T.O. Isolation and NMR characterization of fumonisin B₂ and B₆, a new fumonisin from *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(2): 949-953 (doi: 10.1021/jf902834g).
 15. Chang M., Wang J., Tian F., Zhang Q., Ye B. Antibacterial activity of secondary metabolites from *Aspergillus awamori* F12 isolated from rhizospheric soil of *Rhizophora stylosa* Griff. *Acta Microbiologica Sinica (Wei Sheng Wu Xue Bao)*, 2010, 50(10): 1385-1391.
 16. Ismaiel A.A., Rabie G.H., Abd El-Aal M.A. Antimicrobial and morphogenic effects of emodin produced by *Aspergillus awamori* WAIR 120. *Biologia*, 2016, 71(5): 464-474 (doi: 10.1515/biolog-2016-0067).
 17. Logriego A., Ferracane R., Haydukowsky M., Cozzi G., Ritieni A. Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* from grapes and natural occurrence in must. *Food Additives and Contaminant. Part A*, 2009, 26(11): 1495-1500 (doi: 10.1080/02652030903148322).
 18. Noomin P., Mahakarnchanakul W., Nielsen K.F., Frisvad J.C., Samson R.A. Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* in Thai coffee beans. *Food Additives and Contaminant. Part A*, 2009, 26(1): 94-100 (doi: 10.1080/02652030802366090).
 19. Storari M., Dennert F.G., Bigler L., Gessler C., Broggini G.A.L. Isolation of mycotoxins producing black *Aspergilli* in herbal teas available on the Swiss market. *Food Control*, 2012, 26(1): 157-161 (doi: 10.1016/j.foodcont.2012.01.026).
 20. Soares C., Calado T., Venâncio A. Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 2013, 30(1): 9-13 (doi: 10.1016/j.riam.2012.05.002).
 21. Massi F.P., Sartori D., Ferranti L.S., Lamanaka B.T., Taniwaki M.H., Vieira M.L.C., Fungaro M.H.P. Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 221: 19-28 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.010).
 22. Yanai M., Kajihara C., Kimura A., Motoki O., Hiroshi B., Shun'ichi U. Identification and fumonisin B₂ production of black aspergilli isolated from moldy dried fruits. *Japanese Journal of Food Microbiology*, 2013, 30: 33-38 (doi: 10.5803/jsfm.30.33).
 23. Onami J.-I., Watanabe M., Yoshinari T., Hashimoto R., Kitayama M., Kobayashi N., Sugita-Konishi Y., Kamata Y., Takahashi H., Kawakami H., Terajima J. Fumonisin-production by *Aspergillus* section *Nigri* isolates from Japanese foods and environments. *Food Safety*, 2018, 6(2): 74-82 (doi: 10.14252/foodsafetyfscj.2018005).
 24. Gil-Serna J., García-Díaz M., Vázquez C., González-Jaén M.T., Patiño B. Significance of *Aspergillus niger* aggregate species as contaminants of food products in Spain regarding their occurrence and their ability to produce mycotoxins. *Food Microbiology*, 2019, 82: 240-248 (doi: 10.1016/j.fm.2019.02.013).
 25. Mikušová P., Caboň M., Melichárková A., Urík M., Ritieni A., Slovák M. Genetic diversity, ochratoxin A and fumonisin profiles of strains of *Aspergillus* section *Nigri* isolated from dried vine fruits. *Toxins*, 2020, 12(9): 592 (doi: 10.3390/toxins12090592).
 26. Accensi F., Abarca M.L., Cabañes F.J. Occurrence of *Aspergillus* species in mixed feed and component raw materials and their ability to produce ochratoxin A. *Food Microbiology*, 2004, 21(5): 623-627 (doi: 10.1016/j.fm.2003.12.003).
 27. Dalcero A., Magnoli C., Hallak C., Chiacchiera S.M., Palacio G., Rosa C.A.R. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. *Food Additive and Contaminants*, 2002, 19(11): 1065-1072 (doi: 10.1080/02652030210151895).
 28. Raper K.B., Fennell D.I. *The genus Aspergillus*. The Williams & Wilkins Comp., Baltimore, 1965.
 29. Пирязева Е.А., Малиновская Л.С. Распространенность грибов рода *Aspergillus* Link в кормах. *Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»*, 2013, 2(10): 28-31.
 30. Пирязева Е.А., Малиновская Л.С. Микобиота сенажированных кормов, заготовленных в Московской области. *Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»*, 2014, 2(12): 26-32.
 31. Samson R.A., Visagie C.M., Houbraken J., Hong S.-B., Hubka V., Klaassen C.H.W., Perrone G., Seifert K.A., Susca A., Tanney J.B., Varga J., Kocsube S., Szigeti G., Yaguchi T., Frisvad J.C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 2014, 78(1): 141-173 (doi: 10.1016/j.simyco.2014.07.004).
 32. Frisvad J.C., Petersen L.M., Lyhne E.K., Larsen T.O. Formation of sclerotia and production of indoloterpenes by *Aspergillus niger* and other species in section *Nigri*. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): e94857 (doi: 10.1371/journal.pone.0094857).

33. Ellena V., Bucchieri D., Arcalis E., Sauer M., Steiger M.G. Sclerotia formed by citric acid producing strains of *Aspergillus niger*: induction and morphological analysis. *Fungal Biology*, 2021, 125(6): 485-494 (doi: 10.1016/j.funbio.2021.01.008).
34. Кононенко Г.П., Пирязева Е.А., Зотова Е.В., Буркин А.А. Видовой состав и токсикологическая характеристика грибов рода *Aspergillus*, выделенных из грубых кормов. *Сельскохозяйственная биология*, 2017, 52(6): 1279-1286 (doi: 10.15389/agrobiology.2017.6.1279rus).
35. Susca A., Proctor R.H., Morelli M., Haidukowski M., Gallo A., Logrieco A.F., Moretti A. Variation in fumonisin and ochratoxin production associated with differences in biosynthetic gene content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* isolates from multiple crop and geographic origins. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1412 (doi: 10.3389/fmicb.2016.01412).
36. Han X., Jiang H., Xu J., Zhang J., Li F. Dynamic fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* intended used in food industry in China. *Toxins*, 2017, 9(7): 217 (doi: 10.3390/toxins9070217).
37. Буркин А.А., Кононенко Г.П. Новая иммуноферментная тест-система для анализа фуонизинов (В₁, В₂, В₃). *Иммунология, аллергология, инфектология*, 2010, 1: 187.
38. Palencia E.R., Mitchel T.R., Snook M.E., Glenn A.E., Gold S., Hinton D.M., Riley R.T., Bacon C.W. Analyses of black *Aspergillus* species of peanut and maize for ochratoxins and fumonisins. *Journal of Food Protection*, 2014, 77(5): 805-813 (doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-321).
39. Mogensen J.M., Frisvad J.C., Thrane U., Nielsen K.F. Production of fumonisin B₂ and B₄ by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(2): 954-958 (doi: 10.1021/jf903116q).
40. *Fungi and food spoilage. 2nd edition* /J.I. Pitt, A.D. Hocking (eds.). Academic and Professional, London, 1997.
41. Accensi F., Abarca M.L., Cano J., Figuera F., Cabaces F.J. Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2001, 79(3-4): 365-370 (doi: 10.1023/a:1012003813985).
42. Frisvad J.C., Larsen T.O., Thrane U., Meijer M., Varga J., Samson R.A., Nielsen K.F. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS ONE*, 2011, 6(8): e23496 (doi: 10.1371/journal.pone.0023496).
43. Logrieco A.F., Haidukowski M., Susca A., Mulè G., Munkvold G.P., Moretti A. *Aspergillus* section *Nigri* as contributor of fumonisin B₂ contamination in maize. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2014, 31(1): 149-155 (doi: 10.1080/19440049.2013.862349).
44. Perrone G., Stea G., Epifani F., Varga J., Frisvad J.C., Samson R.A. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biology*, 2011, 115(11): 1138-1150 (doi: 10.1016/j.funbio.2011.07.008).
45. Palumbo J.D., O'Keeffe T.L. Detection and discrimination of four *Aspergillus* section *Nigri* species by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 2015, 60(2): 188-195 (doi: 10.1111/lam.12358).
46. Saadullah A.A., Abdullah S.K. Detection of ochratoxigenic potential in some *Aspergillus* and *Penicillium* isolates from vineyard soil, fresh and dried grapes by ELISA. *Rafidain Journal of Science*, 2018, 27(4): 1-7 (doi: 10.33899/rjs.2018.159364).
47. Susca A., Stea G., Mulè G., Perrone G. Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on the calmodulin gene. *Food Additives and Contaminants*, 2007, 24(10): 1154-1160 (doi: 10.1080/02652030701546206).
48. Martins H.M., Martins H.L., Bernardo F., Gimeno A. Ability of wild strains of *Aspergillus niger* to produce ochratoxin A in cracked maize. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 2005, 100(555/556): 189-192.
49. Susca A., Proctor R.H., Mulè G., Stea G., Ritieni A., Logrieco A.F., Moretti A. Correlation of mycotoxin fumonisin B₂ production and presence of the fumonisin biosynthetic gene *fum8* in *Aspergillus niger* from grape. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(16): 9266-9272 (doi: 10.1021/jf101591x).
50. Gil-Serna J., García-Díaz M., González-Jaén M.T., Vázquez C., Patiño B. Description of an orthologous cluster of ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus* and *Penicillium* species. A comparative analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 268: 35-43 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.028).
51. Fanelli F., Schmidt-Heydt M., Haidukowski M., Geisen R., Logrieco A., Mulè G. Influence of light on growth, conidiation and the mutual regulation of fumonisin B₂ and ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus niger*. *World Mycotoxin Journal*, 2012, 5(2): 169-176 (doi: 10.3920/WMJ2011.1364).
52. Varga J., Rigó K., Lamper C., Téren J., Szabó G. Kinetics of ochratoxin A production in different *Aspergillus* species. *Acta Biologica Hungarica*, 2002, 53(3): 381-388.
53. Mogensen J.M., Nielsen K.F., Samson R.A., Frisvad J.C., Thrane U. Effect of temperature and water activity on the production of fumonisins by *Aspergillus niger* and different *Fusarium* species. *BMC Microbiology*, 2009, 9(1): 281 (doi: 10.1186/1471-2180-9-281).
54. Lasram S., Hamdi Z., Chenenaoui S., Mliki A., Ghorbel A. Comparative study of toxigenic potential of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* isolated from Barley as affected by temperature, water activity and carbon source. *Journal of Stored Products Research*, 2016, 69: 58-64 (doi:

- 10.1016/j.jspr.2016.06.002).
55. Yu R., Liu J., Wang Y., Wang H., Zhang H. *Aspergillus niger* as a secondary metabolite factory. *Frontiers in Chemistry*, 2021, 9: 701022 (doi: 10.3389/fchem.2021.701022).
 56. Wani M.A., Sanjana K., Kumar D.M., Lal D.K. GC-MS analysis reveals production of 2-phenylethanol from *Aspergillus niger* endophytic in rose. *Journal of Basic Microbiology*, 2010, 50(1): 110-114 (doi: 10.1002/jobm.200900295).
 57. Hiort J., Maksimenka K., Reichert M., Perović-Ottstadt S., Lin W.H., Wray V., Steube K., Schaumann K., Weber H., Proksch P., Ebel R., Müller W.E.G., Bringmann G. New natural products from the sponge-derived fungus *Aspergillus niger*. *Journal of Natural Products*, 2004, 67(9): 1532-1543 (doi: 10.1021/np030551d).
 58. Буркин А.А., Кононенко Г.П. Контаминация микотоксинами луговых трав в европейской части России. *Сельскохозяйственная биология [Agricultural Biology]*, 2015, 50(4): 503-512 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.4.503rus).
 59. Кононенко Г.П., Зотова Е.В., Буркин А.А. Опыт микотоксикологического обследования зернофуражных культур. *Сельскохозяйственная биология [Agricultural Biology]*, 2021, 56(5): 958-967 (doi: 10.15389/agrobiology.2021.5.958rus).
 60. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Воловик В.Т., Сергеева С.Е. Комплекс микотоксинов в растениях рапса и сурепицы в весенне-летний период. *Сельскохозяйственная биология [Agricultural Biology]*, 2022, 57(5): 992-1000 (doi: 10.15389/agrobiology.2022.5.992rus).

*Всероссийский НИИ ветеринарной санитарии, гигиены
и экологии – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН,
123022 Россия, г. Москва, Звенигородское ш., 5, стр. 1,
e-mail: kononenkogp@mail.ru ✉, piryazeva01@yandex.ru,
aaburkin@mail.ru, zotelena63@mail.ru*

*Поступила в редакцию
19 февраля 2024 года*

Sel'skhozhozaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2024, V. 59, № 3, pp. 550-560

PRODUCTION OF OCHRATOXIN A, FUMONISINS AND EMODIN BY *Aspergillus niger* ISOLATES FROM FEED PRODUCTS

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

All-Russian Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene, and Ecology—Branch of FSC ARRIEV RAS, 5, Zvenigorodskoe sh., Moscow, 123022 Russia, e-mail kononenkogp@mail.ru (✉ corresponding author), piryazeva01@yandex.ru, aaburkin@mail.ru, zotelena63@mail.ru

ORCID:

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

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

Piryazeva E.A. orcid.org/0000-0002-9144-615X

Zotova E.V. orcid.org/0000-0002-9144-615X

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The work was carried out in accordance with the State Task on the topic: FGUG-2022-0008 “To scientifically substantiate and develop new methods, tools and technologies for ensuring sustainable veterinary and sanitary welfare of animal husbandry”, R&D registration number in CITIS 122042700106-1.

Final revision received February 19, 2024

doi: 10.15389/agrobiology.2024.3.550eng

Accepted May 17, 2024

Abstract

Micromycetes of one of the most complex taxonomically complex *Aspergillus niger* (the *A. niger* “aggregate”) in recent decades have invariably remained the object of close attention of researchers due to the risks of negative effects on humans and animals. For industrial and collection strains, the ability to synthesize toxic metabolites with particularly dangerous forms of action has been established — ochratoxin A (M.L. Abarca et al., 1994; J. Téryn et al., 1996; J. Varga et al., 2002), group B fumonisins (J.C. Frisvad et al., 2007; J.M. Mogensen et al., 2010; M. Mensson et al., 2010) and emodin (A.A. Ismaiel et al. 2016). Strains producing ochratoxin A and fumonisins have been identified in food (P. Noomin et al., 2009; M. Storari et al., 2012; M. Yanai et al., 2013) and feed products (A. Dalcero et al., 2002; F. Accensi et al., 2004). In Russia, priority in the study of these fungi was given to assessing their danger as pathogens of mycoses in the human environment (A.B. Kulko, 2012; O.E. Marfenina et al., 2014). In this work, for the first time for *A. niger* from domestic grain feed products and stored grass feeds (E.A. Piryazeva, L.S. Malinovskaya, 2013, 2014), the features of mycotoxin production was established, the influence of the type of substrate on the intensity of toxin formation *in vitro* was shown, and it was confirmed that it belongs to the species *A. niger* as part of *A. niger* “aggregate” (R.A. Samson et al., 2007). The purpose of the study was to assess the ability of *A. niger* cultures isolated from combined feed, five types of feed raw materials and hay of different botanical composition and territorial origin to produce B group fumonisins (FUM), ochratoxin A (OA), emodin (EMO), as well as to clarify their species according to the totality of morphological,

physiological characteristics and composition of metabolites. For 12 monoconidial strains, toxin production was assessed on sucrose agar with yeast extract (YES), Czapek agar with yeast autolysate extract and 20% sucrose (CYA20S) and on rice grain. After incubation (7 days, 25°C), the extracts were analyzed using test systems for enzyme-linked immunosorbent determination of mycotoxins (STO VNIIVSGE). According to morphological criteria (diameter of colonies, growth pattern, color, consistency of colonies, shape and width of the growing edge, shape of the conidial head, structure and pigmentation of conidiophores, size, shape and color of vesicles, metulae, phialids and conidia), according to the absence of sclerotia, results of Ehrlich test and the ability to produce OA and FUM, their belonging to the species *A. niger* in the clade of biseriata species was confirmed (R.A. Samson et al., 2007; J. Varga et al., 2011). The accumulation of FUM in 7 strains was 0.2 to 630 µg/g and absent in 5; all strains produced OA (from 0.005 to 0.064 µg/g) and EMO (from 0.004 to 0.9 µg/g). The difference in the accumulation of mycotoxins on agar media and grain substrate confirms the influence of substrate components on the activity of determinant gene clusters. Due to the weak potential for producing OA, EMO and the small proportion of active FUM producers, the contribution of *A. niger* to the contamination of grain feed and hay, even with intensive infestation, is unlikely to be significant.

Keywords: *Aspergillus niger*, feed raw materials, combined feed, hay, B group fumonisins, ochratoxin A, emodin, ELISA.