

СПОСОБНОСТЬ ПРОДУЦИРОВАТЬ ОХРАТОКСИН А И ЦИТРИНИН У *Penicillium verrucosum* И *P. viridicatum* ИЗ ЗЕРНА И ТРАВЯНЫХ КОРМОВ, ОТОБРАННЫХ В РАЗНЫХ РЕГИОНАХ РОССИИ*

Г.П. КОНОНЕНКО , Е. А. ПИРЯЗЕВА, А.А. БУРКИН, Е.В. ЗОТОВА

В последние десятилетия достигнут значительный прогресс в изучении распространенности представителей рода *Penicillium* подрода *Penicillium* в объектах окружающей среды и способности этих грибов продуцировать широкий спектр токсичных метаболитов (Т. Rundberget с соавт., 2004; J. O'Callaghan с соавт., 2013; M. Schmidt-Heydt с соавт., 2015). В ряде европейских стран для одного из видов — *P. verrucosum* Dierckx показана преимущественная распространенность на злаках и прямая связь с зараженностью зерна грибом и частотой обнаружения метаболитов с нефротоксическим действием (F. Lund, J.C. Frisvad, 2003; M. Lindblad с соавт., 2004; S. Elmholt, P.H. Rasmussen, 2005). Однако доступные сведения о характере токсинообразования у этого гриба при контаминации им зерна и кормовых объектов остаются весьма ограниченными (M.R. Bragulat с соавт., 2008; V. Koteswara Rao с соавт., 2011). В России токсигенному потенциалу микроскопических грибов, поражающих корма, посвящена недавняя серия публикаций, включающая, в том числе, данные по 11 видам *Penicillium* (А.А. Буркин с соавт., 2019; Г.П. Кононенко с соавт., 2021). В настоящей работе впервые среди изолятов, ранее отнесенных к таксону *Penicillium viridicatum* Westling (К.В. Raper с соавт., 1949) и встречающихся с частотой 20 % в зерне пшеницы, ячменя, овса, ржи (Е.А. Piryaeva, L.S. Malinovskaya, 2014) и 1,3 % — в сухих травяных кормах (сено, солома) (Е.А. Piryaeva, 2017), идентифицированы виды *P. verrucosum* Dierckx и *Penicillium viridicatum* Westling и дана оценка их токсигенности *in vitro*. Целью исследования была видовая идентификация 33 изолятов и тестирование у идентифицированных видов способности продуцировать охратоксин А (ОА) и цитринин (ЦИТ) на зерновых субстратах. Видовую идентификацию грибов проводили в соответствии с руководством (J.C. Frisvad, R.A. Samson, 2004). Культуры выращивали на сахарозном агаре с дрожжевым экстрактом (YES), сахарозном агаре с креатином (CREA), агаре Чапека с экстрактом автолизата дрожжей (CYA) в течение 7 сут при 25 °С и 30 °С. Подкисление среды CREA при выращивании культур определяли по изменению ее цвета. Инокулюм для экспресс-тестирования выращивали на скошенном агаре Чапека-Докса в течение 7-10 сут при температуре 23-25 °С. После культивирования грибов на увлажненном зерне риса (7 сут, 25 °С, без освещения) в экстрактах биомассы измеряли содержание ОА и ЦИТ методом непрямого конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA) с помощью аттестованных коммерческих тест-систем (ВНИИВСГЭ, Россия). По морфологическим характеристикам, а также по скорости роста, окраске колоний и реакции на кислотность, определенным на панели из трех тестовых сред, 8 культур были отнесены к виду *P. viridicatum*, 25 — к *P. verrucosum*. Ни один из штаммов *P. viridicatum* не образовывал ОА и/или ЦИТ. Все штаммы *P. verrucosum* продуцировали ЦИТ и часть из них — ОА. У 17 штаммов, реализующих биосинтез обоих метаболитов, накопление ЦИТ в среднем по выборке было примерно в 15 раз выше, чем ОА. Накопление ОА свыше 10 мкг/г выявили лишь у 12 % продуцентов. Абсолютное большинство (92 %) штаммов *P. verrucosum* накапливали ЦИТ в количествах более 10 мкг/г, из них 48 % — 100 мкг/г и выше, что позволило считать их высокоактивными продуцентами. Полученные сведения дают основания предположить причастность вида *P. verrucosum* к сочетанной контаминации отечественной зерновой продукции и травяных кормов микотоксинами ОА и ЦИТ.

Ключевые слова: *Penicillium verrucosum*, *P. viridicatum*, зернопродукция, травяные корма, охратоксин А, цитринин, иммуноферментный анализ.

В последние десятилетия достигнут значительный прогресс в изучении распространенности видов *Penicillium* подрода *Penicillium* в объектах окружающей среды и способности таких видов продуцировать широкий спектр метаболитов с токсическим действием (1-3). В ряде европейских стран для одного из них — *P. verrucosum* Dierckx показана преимущественная распространенность на злаках и прямая связь между пораженностью

* 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.

зерна и частотой обнаружения их метаболитов с нефропатическим действием (4-6). Однако доступные сведения о характере токсинообразования у изолятов этого гриба, выделенных из зерна и кормовых объектов, остаются весьма ограниченными. Так, в Испании у 11 изолятов *P. verrucosum* из злаков и кормов обнаружен охратоксин А (ОА) в количествах от 0,02 до 213 мкг/г и у 10 подтверждено образование цитрина (ЦИТ) (7). При исследовании кормов в Индии для 22 штаммов из 30 показана способность продуцировать ОА и ЦИТ, однако какие-либо пояснения относительно их количества, раздельного или совместного обнаружения отсутствуют (8).

Многие годы совокупность культурально-морфологических признаков, введенных для описания таксона *P. viridicatum* Westling (9), служила основой для поиска этого микромицета в объектах окружающей среды (10, 11) и изучения его токсинообразования (12, 13). Однако позднее было предложено несколько подходов для выделения групп в пределах вида по фенотипическим, биосинтетическим и экологическим критериям (14-16).

В России токсигенному потенциалу микроскопических грибов, поражающих корма, посвящена серия недавних публикаций, в том числе по 11 видам *Penicillium* (17, 18). По данным российских исследователей, культурально-морфологические признаки, ранее принятые для *P. viridicatum* Westling (9), оказались характерными для изолятов, которые в зерне пшеницы, ячменя, овса, ржи встречаются с частотой 20 % (19), в сухих травяных кормах (сено, солома) — с частотой 1,3 % (20).

В настоящей работе нами впервые установлено, что в этой группе изолятов представлены в основном вид *P. verrucosum* и реже *P. viridicatum*, дана оценка особенностей их токсинообразования *in vitro* и показано, что *P. verrucosum* может иметь отношение к контаминации зерновых и травяных кормов нефротоксинами.

Целью исследования стала оценка токсигенности культур *P. viridicatum* Westling (9), выделенных из зерна и травяных кормов, описание их макро- и микроморфологических свойств и сравнение идентифицированных видов по способности продуцировать охратоксин А и цитринин.

Методика. Изучали 33 изолята, предварительно идентифицированные по определителю (9) как *P. viridicatum* Westling, из исследовательской коллекции лаборатории микотоксикологии и санитарии кормов (ВНИИВСГЭ — филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН). Из зерна грибы выделяли после его поверхностной дезинфекции, из шрота подсолнечного и гороха — после измельчения и приготовления взвесей посредством последовательных 10-кратных разведений в 0,1 % водном растворе Tween 80, из силоса и сена — прямым посевом мелких измельченных фрагментов; чистые культуры хранили в пробирках на агаре Чапека-Докса (ЧДА) при температуре 5 °С.

Микроморфологические характеристики (строение кисточки, размеры конидиеносцев, ветвей, метул, фиалид и конидий) определяли для изолятов, выращенных на ЧДА (9), с помощью микроскопа (Eclipse E200, «Nikon», Япония) при 400-кратном увеличении. Макроморфологические свойства грибов изучали в соответствии с описанием (21). Культуры выращивали в течение 7 сут на следующих средах: YES (сахарозный агар с дрожжевым экстрактом: дрожжевой экстракт 20 г, сахароза 150 г, магний сернокислый 7-водный 0,5 г, медь сернокислая 5-водная 0,005 г, цинк сернокислый 7-водный 0,01 г, агар 20 г, дистиллированная вода 1000 мл), 25 °С; CREA (сахарозный агар с креатином: моногидрат креатина 3 г, сахароза 30 г, калий фосфорнокислый двузамещенный 7-водный 1,6 г, магний сернокислый 7-водный 0,5 г, калий хлористый 0,5 г, железо сернокислое(II) 7-водное 0,01 г, медь сернокислая 5-водная 0,005 г, цинк сернокислый 7-водный

0,01 г, бромкрезоловый пурпурный 0,05 г, агар 20 г, дистиллированная вода 1000 мл), 25 °С; СУА (агар Чапека с экстрактом автолизата дрожжей: натрий азотнокислый 3 г, экстракт автолизата дрожжей 5 г, сахара 30 г, калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный 1,3 г, магний сернокислый 7-водный 0,5 г, калий хлористый 0,5 г, железо сернокислое(II) 7-водное 0,01 г, медь сернокислая 5-водная 0,005 г, цинк сернокислый 7-водный 0,01 г, агар 15 г, дистиллированная вода 1000 мл), 25 °С, 30 °С. Подкисление среды СREA при культивировании изолятов определяли по изменению ее цвета (21).

Для оценки токсинообразования культур в качестве субстрата использовали шлифованный круглозерный рис. Дополнительно для одного из штаммов (№ 74/2) — овсяные хлопья, пшеницу, ячмень, овес, просо и кукурузу (в виде круп). Инокулом готовили, выращивая изоляты на скошенном агаре Чапека-Докса в течение 7-10 сут при температуре 23-25 °С. С помощью микологического крючка инокулом переносили в стеклянные флаконы объемом 10 мл с диаметром дна 18 мм, содержащие по 1 г зернового субстрата, который перед автоклавированием увлажняли 1 мл воды. Каждый вариант опыта выполняли в трех повторностях. После посева флаконы, закрытые ватно-марлевыми пробками и слоем пленки (Parafilm M® PM-996, «Pechiney Plastic Packaging», США), выдерживали в темноте при 25 °С в течение 7 сут. Затем в каждый добавляли по 3 мл смеси ацетонитрила и воды в объемном соотношении 84:16 и интенсивно встряхивали в начале и конце 14-часовой стационарной инкубации. После разведения экстрактов фосфатно-солевым буферным раствором рН 7,4 с Tween 20 концентрации ОА и ЦИТ определяли методом непрямого конкурентного иммуноферментного анализа с помощью аттестованных коммерческих тест-систем в соответствии с рекомендациями производителя (ВНИИВСГЭ, Россия). Пределы определения ОА и ЦИТ составили соответственно 0,08 нг/мл и 0,4 нг/мл. Измерения выполняли на планшетном фотометре (Stat Fax-2100, «AWA-RENESS Technology, Inc.», США, госреестр № 47063-11).

Результаты выражали как средние арифметические значения (M) и стандартные ошибки средних ($\pm SEM$).

Результаты. Образцы зерна и травяных кормов для изучения были отобраны в разные годы (табл. 1):

1. Происхождение изолятов изученной выборки, исходно идентифицированных как *Penicillium viridicatum* Westling

Объект (число образцов)	Территория, год	Число изолятов (рег. №)
Зерно пшеницы ($n = 5$)	Тульская обл., 2005	1 (56/3)
	Волгоградская обл., 2005	1 (64/3)
	Приморский край, 2008	1 (173/6)
	Республика Саха (Якутия), 2009	2 (253/10, 253/11)
	Республика Саха (Якутия), 2009	6 (254/3, 254/6-1, 254/6-2, 254/10, 254/13-1, 254/13-2)
Зерно ячменя ($n = 4$)	Тульская обл., 2005	1 (54/3)
	Алтайский край, 2011	1 (263/2)
	Красноярский край, 2011	1 (279/7)
	Тульская обл., 2011	1 (287/4)
Зерно овса ($n = 2$)	Липецкая обл., 2005	1 (50/2)
	Тульская обл., 2005	1 (61/2)
Зерно ржи ($n = 1$)	Оренбургская обл., 2011	3 (292/3, 292/4, 292/5)
Зерно гороха ($n = 2$)	Тюменская обл., 2005	3 (45/3, 45/4, 45/5)
	Тюменская обл., 2005	4 (46/1, 46/4, 46/7, 46/8)
Шрот подсолнечный ($n = 2$)	Краснодарский край, 2006	1 (74/2)
	Приморский край, 2006	1 (101/11)
Силос ($n = 1$)	Московская обл., 2013	1 (5/1)
Сено ($n = 3$)	Московская обл., 2013	3 (181/3, 314/2, 462/8)

Исходные изоляты характеризовались общими микроморфологиче-

скими признаками. Шероховатые конидиеносцы размером $200 \times 3,4-4,0$ мкм были собраны в коремии. Имелись шаровидные и полушаровидные конидии ($3,0-3,5$ мкм) с гладкими или немного шероховатыми стенками, несимметрично ветвящиеся кисточки из нескольких неприжатых ветвей ($10-20 \times 2,8-3,5$ мкм) с метулами цилиндрической формы размером $9-15 \times 2,5-3,3$ мкм по 2-4 в пучке, фиалиды размером $7-9 \times 2,5-3,5$ мкм по 3-5 в пучке. Более выраженную шероховатость конидиеносцев отмечали у восьми из изученных изолятов. У этих изолятов диаметр колоний на среде YES составил 25-40 мм (обратная сторона желтого цвета), на CREA — 17-24 мм, на CYA — 19-35 мм при 25 °C и 6-18 мм при 30 °C; при культивировании на CREA происходило подкисление среды с изменением ее цвета. Полученные данные позволили идентифицировать эти штаммы как *P. viridicatum* Westling (серия *Viridicata*). Два из них были выделены из образца гороха (№№ 46/7, 46/8), один — из зерна ячменя (№ 56/3) и пять — из зерна пшеницы (№№ 254/6-1, 254/6-2, 254/10, 254/13-1, 254/13-2). Остальные 25 штаммов характеризовались меньшей скоростью роста, не подкисляли среду CREA, по размеру и цвету колоний соответствовали виду *P. verrucosum* Dierckx (серия *Verrucosa*): диаметр колоний на среде YES составлял 20-32 мм (обратная сторона терракотового цвета), на CREA — 12-15 мм, на CYA при 25 °C — 15-24 мм (обратная сторона кремово-желтая, часто с коричневым центром), при 30 °C рост отсутствовал. Оба вида по совокупности микро- и макроморфологических признаков принадлежали к секции *Viridicata* (21, 22).

На современном этапе для определения и уточнения таксономического положения грибов используется их культивирование на агаризованных и жидких средах с последующим применением для анализа образцов биомассы хроматографических приемов (23, 24). Для оценки продуцирования микотоксинов у изолятов мы использовали зерновой субстрат, который, по нашим данным, обеспечивает наибольшую интенсивность токсинообразования (17, 18), и количественное определение аналитов методом иммуноферментного анализа (ELISA-тест). Наши результаты полностью соответствуют данным по хемотаксономическим маркерам, описанным для обоих видов (25, 26). Так, в образцах *P. viridicatum* ОА и ЦИТ детектировать не удалось, тогда как для *P. verrucosum* получено подтверждение способности к биосинтезу нефротоксинов: все штаммы *P. verrucosum* продуцировали ЦИТ, а часть из них — ОА (табл. 2).

2. Продуцирование охратоксина А и цитринина у 25 изолятов *Penicillium verrucosum* Dierckx из изученной выборки при росте на зерне риса (7 сут, 25 °C; $M \pm SEM$)

Штамм, рег. №	Количество токсина, мкг/г субстрата	
	охратоксин А	цитринин
5/1	1,8±0,4	82±10
45/3	1,3±0,3	130±33
45/4	1,8±0,5	92±12
50/2	4,5±0,8	37±6
64/3	34,0±6,0	140±28
74/2	4,2±0,8	50±8
101/11	3,0±0,6	70±12
173/6	2,2±0,4	40±5
181/3	2,7±0,5	20±5
253/10	0,02±0	4±1
253/11	0,04±0,01	112±20
263/2	0,9±0,2	65±14
287/4	23,0±5,0	100±20
292/3	15,0±3,0	317±50

292/4	1,3±0,3	43±5
314/2	0,5±0,1	68±10
462/8	1,9±0,4	119±18
min-M-max	0,02-6-34	4-88-317
45/5	—	100±20
46/1	—	180±30
46/4	—	5±1
54/3	—	130±25
61/2	—	124±23
254/3	—	67±12
279/7	—	170±35
292/5	—	77±12
min-M-max	—	5-107-180

Примечание. Прочерки означают, что охратоксин А не обнаружен.

У 17 штаммов, продуцирующих оба метаболита, накопление ЦИТ в среднем по выборке было примерно в 15 раз выше, чем ОА. Один из продуцентов (№ 74/2), у которого соотношение ОА/ЦИТ при росте на зерне риса составило $4,2 \pm 0,8 / 50 \pm 8$ мкг/г (см. табл. 2), в тех же условиях на пяти других видах зерна также преимущественно продуцировал ЦИТ в сравнении с ОА: $2 \pm 0,4 / 37 \pm 5$ мкг/г на пшенице, $0,9 \pm 0,2 / 21 \pm 2$ мкг/г на ячмене, $1,7 \pm 0,4 / 38 \pm 6$ мкг/г на овсе, $0,2 \pm 0,1 / 10 \pm 2$ мкг/г на просе и $0,1 \pm 0,05 / 55 \pm 8$ мкг/г на кукурузе. Сходное соотношение количеств ОА/ЦИТ ранее было определено для коллекционного штамма *P. verrucosum* ККР 480 при длительном культивировании (40 сут, 20 °С) на рисе (30/75 мкг/г), пшенице (15/60 мкг/г), ячмене (10/30 мкг/г), тритикале (8/10 мкг/г) и кукурузе (5/8 мкг/г) (27). По-видимому, варьирование биохимического состава этих зерновых сред не имеет существенного значения для общего этапа синтеза поликетидных компонентов ОА и ЦИТ, а также для тех стадий, на которых происходит достраивание молекулы ОА аминокислотной частью и введение атома хлора (27).

У других 8 штаммов *P. verrucosum* обнаруженные количества ЦИТ оставались примерно в том же диапазоне, что и у продуцентов двух микотоксинов, но при этом ОА найден не был (см. табл. 2). Признавая этот вид фенотипически обособленным, исследователи обращают внимание на высокое генетическое разнообразие его популяций на злаках (28). Действительно, все штаммы, лишенные способности продуцировать ОА, были выделены из зерна злаковых — пшеницы, ячменя, овса, ржи, а также из гороха. Источниками контаминации отечественной зернопродукции, по-видимому, могут быть оба хемотипа гриба. По обобщенным данным за 2004–2009 годы, в кормовом зерне, кормосмесях, жмыхах наблюдалась общая закономерность в соотношении содержания этих токсинов: накопление ЦИТ было, как правило, выше, чем ОА, в 1,1–10 раз (29, 30), но эти исследования не сопровождалось учетом пораженности *P. verrucosum* для контаминированных образцов.

При анализе двух образцов (пшеница и горох), наряду с *P. verrucosum*, был обнаружен *P. viridicatum*, который не образовывал ОА и ЦИТ. Этот же вид как единственный мы выявили в одном из образцов ячменя. Нет сомнений в необходимости более подробно исследовать распространенность *P. viridicatum* в связи с его способностью продуцировать при заражении злаков ксантомегнины, известные своей высокой гепато- и нефротоксичностью, а также виридиновую кислоту — мало изученный микотоксин из группы тетрапептидов (25, 31). Отметим, что для оценки токсигенности изолятов *Penicillium*, контаминирующих зернопродукцию, современные морфологические приемы видовой идентификации должны быть

дополнены молекулярными методами генотипирования и оценки представленности генов, ассоциированных с токсигенезом (32, 33).

Несмотря на малую выборку штаммов *P. verrucosum* из травяных кормов, на основании полученных нами данных можно сделать некоторые сопоставления. Тот же тип токсинообразования, что и у культур из зерновых объектов, с большей интенсивностью накопления ЦИТ, чем ОА (см. табл. 2), вполне соответствует общей ситуации с контаминацией луговых трав и сена (34). Ни один из образцов травяных кормов не был источником атипичных культур, не образующих ОА, и причиной этого, кроме редкой встречаемости вида, вполне может быть однородность его популяций в этих объектах. К сожалению, направленное изучение токсигенности вида *P. verrucosum*, ассоциированного с луговым разнотравьем, пока не проводилось.

Заслуживает внимания склонность *P. verrucosum* к адаптации биосинтеза вторичных метаболитов при изменении внешних условий (35, 36). Резкое смещение в сторону накопления ОА описано при шоковых воздействиях, например при чрезмерном засолении субстрата, окислительном стрессе в присутствии ионов меди (3), использовании глицерина или галактозы как источников углерода (2). По-видимому, именно с этим связан необычный результат, который получен при изучении коллекционных штаммов *P. verrucosum* (IBT, BioCentrum-DTU, Дания) на среде bread analogues из пшеничной муки с добавками маргарина, разрыхлителя, дрожжевого экстракта, глицерина и соли: три штамма образовывали ЦИТ и ОА в равном количестве или с преобладанием ОА и два — только ОА (37). Такая метаболическая пластичность гриба, безусловно, требует точного описания в условиях лабораторного тестирования. Нельзя исключать и то, что в природных популяциях также могут действовать факторы, приводящие к смещению равновесия в путях биосинтеза этих метаболитов. Так, многим вегетирующим луговым травам, как и зернопродукции, свойственна совместная контаминация ОА и ЦИТ, причем, как правило, с заметным количественным преобладанием ЦИТ (34). Однако в редких случаях отмечалось кратное увеличение содержания ОА и оба метаболита обнаруживались в сопоставимых количествах, например у солодки голой и в цветках клевера гибридного и клевера среднего (38).

В нашем исследовании абсолютное большинство (92 %) штаммов *P. verrucosum* накапливали ЦИТ в количествах более 10 мкг/г, из них у 48 % содержание ЦИТ составило ≥ 100 мкг/г, что позволяет считать их высокоактивными продуцентами (39). Напротив, ОА в количестве > 10 мкг/г выявили лишь у 12 % продуцирующих штаммов, причем остальная их часть была вообще лишена такой способности. Все это дает основания сомневаться в правомерности весьма распространенных в литературе указаний на то, что *P. verrucosum* является продуцентом ОА (14, 40, 41) при явной недооценке его способности накапливать ЦИТ (25). Как известно, оба метаболита образуются по общему пути, но если в идентификации генов, ответственных за биосинтез ОА, уже достигнуты значительные успехи (42), активно продолжается изучение факторов, оказывающих влияние на уровни транскрипции гена *otapksPV* и на остальные компоненты кластера, то в отношении ЦИТ пока прослеживают лишь аналогии с другими грибами, в частности с представителями рода *Monascus* (2, 43, 44). Выявление механизмов регуляции токсинообразования у грибов, составляющих природные популяции, становится одним из приоритетных направлений исследований. Развитие альтернативных методов типирования с помощью анализа протеома и генетических маркеров (45) в ближайшем будущем позволяет наде-

яться на их применение и в отношении токсигенных микромицетов, значимых для объектов гигиенического и санитарного контроля.

Таким образом, установлено, что в изученной группе изолятов *Penicillium*, ассоциированных с зерновыми и травяными объектами (образцы, использованные для выделения культур, были отобраны в разные годы на территории Российской Федерации), доминирующее положение принадлежит виду *P. verrucosum*, продуцирующему цитринин (от 5 до 180 мкг/г зернового субстрата) и охратоксин А (от 0,02 до 34 мкг/г), тогда как вид *P. viridicatum*, который не способен к биосинтезу этих метаболитов, встречается редко. Полученные сведения указывают на возможную причастность *P. verrucosum* к сочетанной контаминации отечественной зернопродукции и травяных кормов цитринином и охратоксином А. Учитывая выраженные ответные реакции вида *P. verrucosum* на условия развития, следует продолжить микотоксикологическое изучение его популяций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rundberget T., Skaar I., Fleshyue A. The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 90(2): 181-188 (doi: 10.1016/S0168-1605(03)00291-5).
2. Abbas A., Coghlan A., O'Callaghan J., Garcia-Estrada C., Martin J.F., Dobson A.D.W. Functional characterization of the polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Penicillium verrucosum*. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 161(3): 172-181 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.014).
3. Schmidt-Heydt M., Stoll D., Schütz P., Geisen R. Oxidative stress induces the biosynthesis of citrinin by *Penicillium verrucosum* at the expense of ochratoxin. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 192: 1-6 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.008).
4. Lund F., Frisvad J.C. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95(5): 1117-1123 (doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02076.x).
5. Lindblad M., Johnsson P., Jonsson N., Lindqvist R., Olsen M. Predicting noncompliant levels of ochratoxin A in cereal grain from *Penicillium verrucosum* counts. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97(3): 609-616 (doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02332.x).
6. Elmholt S., Rasmussen P.H. *Penicillium verrucosum* occurrence and ochratoxin A contents in organically cultivated grain with special reference to ancient wheat types and drying practice. *Mycopathologia*, 2005, 159(3): 421-432 (doi: 10.1007/s11046-005-1152-5).
7. Bragulat M.R., Martinez E., Castellá G., Cabaces F.J. Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 126(1-2): 43-48 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.034).
8. Koteswara Rao V., Shilpa P., Girisham S., Reddy S.M. Incidence of mycotoxigenic penicilla in feeds of Andhra Pradesh, India. *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research*, 2011, 2(2): 46-50.
9. Raper K.B., Thom C., Fennel D.I. *A manual of the Penicillia*. The Williams & Wilkins Comp., Baltimore, 1949.
10. Perez Garcia R., Tuite J.F. Screening of *Penicillium* isolates from shelled corn for production of mycotoxins. *Philippine Agriculturist*, 1985, 68(4): 453-459.
11. Stenwig H., Liven E. Mycological examination of improperly stored grains. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 1988, 38(2): 199-205 (doi: 10.1080/00015128809438485).
12. Van Walbeek W., Scott P.M., Harwig J., Lawrence J. W. *Penicillium viridicatum* Westling: a new source of ochratoxin A. *Canadian Journal of Microbiology*, 1969, 15(11): 1281-1285 (doi: 10.1139/m69-232).
13. Krogh P., Hasselager E., Friis P. Studies of fungal nephrotoxicity. II. Isolation of two nephrotic compounds from *Penicillium viridicatum* Westling: Citrinin and oxalic acid. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology*, 1970, 78: 401-413 (doi: 10.1111/j.1699-0463.1970.tb04320.x).
14. Pitt J.I. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53(2): 266-269 (doi: 10.1128/aem.53.2.266-269.1987).
15. Larsen T.O., Svendsen A., Smedsgaard J. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(8): 3630-3635 (doi: 10.1128/AEM.67.8.3630-3635.2001).
16. Cabaces F.J., Bragulat M.R., Castellá G. Ochratoxin A producing species in the genus *Penicillium*. *Toxins*, 2010, 2: 1111-1120 (doi: 10.3390/toxins2051111).
17. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Пирязева Е.А. Потенциал токсинообразования грибов рода

- Penicillium*, поражающих грубые корма. *Сельскохозяйственная биология*, 2019, 54(3): 616-625 (doi: 10.15389/agrobiology.2019.3.616rus).
18. Кононенко Г.П., Пирязева Е.А., Буркин А.А. Интенсивность токсинообразования *Penicillium roqueforti*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum* на зерновых субстратах. *Микология и фитопатология*, 2021, 55(4): 285-290 (doi: 10.31857/S0026364821040073).
 19. Пирязева Е.А., Малиновская Л.С. Виды рода *Penicillium* Link в зерновых кормах. *Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»*, 2014, 1(11): 39-43.
 20. Пирязева Е.А. Грибы рода *Penicillium* Link в грубых кормах. *Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»*, 2017, 4(24): 42-45.
 21. Frisvad J.C., Samson R.A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 2004, 49: 1-174.
 22. Houbraeken J., Kocsuhy S., Visagie C.M., Yilmaz N., Wang X.C., Meijer M., Kraak B., Hubka V., Bensch K., Samson R.A., Frisvad J.C. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): an overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology*, 2020, 95: 5-169 (doi: 10.1016/j.simyco.2020.05.002).
 23. Visagie C.M., Houbraeken J., Frisvad J.C., Hong S.B., Klaassen C.H.W., Perrone G., Siefert K.A., Varga J., Yaguchi T., Samson R.A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 2014, 78(1): 343-371 (doi: 10.1016/j.simyco.2014.09.001).
 24. Антипова Т.В., Желифонова В.П., Козловский А.Г. Метаболомика грибов рода *Penicillium*. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*, 2019, 22(7): 11-25 (doi: 10.29296/25877313-2019-07-02).
 25. Frisvad J.C., Smedsgaard J., Larsen T.O., Samson R.A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 2004, 49: 201-241.
 26. Желифонова В.П., Антипова Т.В., Озерская С.М., Кочкина Г.А., Козловский А.Г. Вторичные метаболиты грибов рода *Penicillium*, выделенных из многолетней мерзлоты, как хемотаксономические маркеры. *Микробиология*, 2009, 78(3): 393-398.
 27. Wawrzyniak J., Waskiewicz A. Ochratoxin A and citrinin production by *Penicillium verrucosum* on cereal solid substrates. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2014, 31(1): 139-148 (doi: 10.1080/19440049.2013.861933).
 28. Frisvad J.C., Lund F., Elmholt S. Ochratoxin A producing *Penicillium verrucosum* isolates from cereals reveal large AFLP fingerprinting variability. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98(3): 684-692 (doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02509.x).
 29. Кононенко Г.П., Буркин А.А. Цитринин и охратоксин А: контаминация кормов. *Иммунология, аллергология, инфектология*, 2010, 1: 196.
 30. Kononenko G.P., Burkin A.A. Peculiarities of feed contamination with citrinin and ochratoxin A. *Agricultural Sciences*, 2013, 4(1): 34-38 (doi: 10.4236/as.2013.41006).
 31. Otero C., Arredondo C., Echeverria-Vega A., Gordillo-Fuenzalida F. *Penicillium* spp. mycotoxins found in food and feed and their health effects. *World Mycotoxin Journal*, 2020, 13(3): 323-343 (doi: 10.3920/WMJ2019.2556).
 32. Toju H., Tanabe A.S., Yamamoto S., Sato H. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLoS ONE*, 2012, 7: e40863 (doi: 10.1371/journal.pone.0040863).
 33. Houbraeken J., Visagie C.M., Meijer M., Frisvad J.C., Busby P.E., Pitt J.I., Seifert K.A., Louis-Seize G., Demirel R., Yilmaz N., Jacobs K., Christensen M., Samson R.A. A taxonomic and phylogenetic revision of *Penicillium* section *Aspergilloides*. *Studies in Mycology*, 2014, 78: 373-451 (doi: 10.1016/j.simyco.2014.09.002).
 34. Буркин А.А., Кононенко Г.П. Контаминация микотоксинами луговых трав в европейской части России. *Сельскохозяйственная биология*, 2015, 50(4): 503-512 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.4.503rus).
 35. Schmidt-Heydt M., Magan N., Geisen R. Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 284 (2): 142-149 (doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01182.x).
 36. Schmidt-Heydt M., Bode H., Raupp F., Geisen R. Influence of light on ochratoxin biosynthesis by *Penicillium*. *Mycotoxin Research*, 2010, 26(1): 1-8 (doi: 10.1007/s12550-009-0034-y).
 37. Kokkonen M., Jestoi M., Rizzo A. The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 99 (2): 207-214 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.014).
 38. Кононенко Г.П., Буркин А.А. Токсины микромицетов в генеративных органах растений семейства *Fabaceae*. *Сельскохозяйственная биология*, 2021, 56(5): 968-978 (doi: 10.15389/agrobiology.2021.5.968rus).
 39. Varga J., Rigy K., Lamper C., Téren J., Szaby G. Kinetics of ochratoxin A production in different *Aspergillus* species. *Acta Biologica Hungarica*, 2002, 53(3), 381-388 (doi: 10.1556/ABiol.53.2002.3.14).
 40. Chu F.S. Studies on ochratoxins. *Critical Reviews in Toxicology*, 1974, 2(4): 499-524 (doi: 10.3109/10408447309025706).
 41. Perrone G., Susca A. *Penicillium* species and their associated mycotoxins. *Methods in Molecular*

- Biology*, 2017, 1542: 107-119 (doi: 10.1007/978-1-4939-6707-0_5).
42. Castellá G., Larsen T.O., Cabaces J., Schmidt H., Alboresi A., Niessen L., Färber P., Gelsen R. Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2002, 25 (1): 74-83 (doi: 10.1078/0723-2020-00094).
 43. Geisen R., Schmidt-Heydt M., Touhami N., Himmelsbach A. New aspects of ochratoxin A and citrinin biosynthesis in *Penicillium*. *Current Opinion in Food Science*, 2018, 23: 23-31 (doi: 10.1016/j.cofs.2018.04.001).
 44. Geisen R., Schmidt-Heydt M., Stoll D., Touhami N. Aspects of the occurrence, genetics, and regulation of biosynthesis of the three food relevant *Penicillium* mycotoxins: ochratoxin A, citrinin, and patulin. In: *Physiology and Genetics*, 2nd Edition. The Mycota XV /T. Anke, A. Schöffler (eds.). Springer International Publishing, AG, 2018: 413-433 (doi: 10.1007/978-3-319-71740-1_14).
 45. Шаров Т.Н., Гришина М.А., Ткаченко Г.А., Шпак И.М. Сравнительная характеристика методов типирования микроскопических грибов (обзор). *Проблемы медицинской микологии*, 2012, 14(2): 18-24.

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,
zotelena63@mail.ru, aaburkin@mail.ru

Поступила в редакцию
4 августа 2023 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2023, V. 58, № 5, pp. 927-936

PRODUCTION OF OCHRATOXIN A AND CITRININ BY *Penicillium verrucosum* AND *P. viridicatum* FROM GRAIN AND HERBAL FODDER COLLECTED IN VARIOUS REGIONS OF RUSSIA

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

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, zotelena63@mail.ru, aaburkin@mail.ru

ORCID:

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

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

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

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

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 August 04, 2023

doi: 10.15389/agrobiology.2023.5.927eng

Accepted October 02, 2023

Abstract

Over the past decades, significant progress has been made in elucidating the prevalence of fungi *Penicillium* subgenus *Penicillium* in the environment and their ability to produce a wide range of metabolites with toxic effects (T. Rundberget et al., 2004; J. O'Callaghan et al., 2013; M. Schmidt-Heydt et al., 2015). In a number of European countries, one of the species, the *P. verrucosum* Dierckx has been shown to predominate on cereals, and a direct relationship has been revealed between the grain infestation and the frequency of detection of nephrotoxins (F. Lund, J.C. Frisvad, 2003; M. Lindblad et al., 2004; S. Elmholt, P.H. Rasmussen, 2005). However, the available data on toxins produced by this fungus in grain products and feeds remain very limited (M.R. Bragulat et al., 2008; V. Koteswara Rao et al., 2011). In Russia, a series of publications has recently been devoted to the toxigenic potential of microscopic fungi affecting feed, including 11 species of *Penicillium* (A.A. Burkin et al., 2019; G.P. Kononenko et al., 2021). The whole set of cultural and morphological features previously accepted for the taxon *P. viridicatum* Westling (K.B. Raper et al., 1949), according to Russian researchers, turned out to be characteristic of isolates occurring with a frequency of 20 % in wheat, barley, oats, rye (E.A. Piryazeva, L.S. Malinovskaya, 2014) and with 1.3 % in dry grass feeds (hay, straw) (E.A. Piryazeva, 2017). Here, for the first time, it is shown that a set of isolates differing in terms of sites and years of collecting is mostly *P. verrucosum*, and its capability of toxigenic production in vitro is assessed. In addition, this work is the first in which *P. verrucosum* Dierckx and *P. viridicatum* Westling were discovered among isolates previously assigned to the taxon (according to K.B. Raper et al., 1949), and the characteristics of their toxin production in vitro were assessed. The aim of the study was to evaluate ochratoxin A (OA) and citrinin (CIT) production on grain substrates in a set of 33 isolates from grain and fodder sampled in various Russian regions in different years and deposited into a local

collection as *Penicillium viridicatum* Westling. Prior to toxin production assessment, the modern morphological criteria were applied to check taxonomic assignment of the isolates tested. Species identification was performed in accordance with the guidelines (J.C. Frisvad, R.A. Samson, 2004). Cultures were grown on sucrose agar with yeast extract (YES), sucrose agar with creatine (CREA), Chapek agar with yeast autolysate extract (CYA) for 7 days at 25 °C and 30 °C. The acidity index was determined by the change in the CREA medium colour. Fungal inoculum was grown on Chapek-Dox agar for 7-10 days at 23-25 °C. After culturing fungi on moistened rice grain (7 days, 25 °C, without lighting), the OA and CIT content in biomass extracts was measured by indirect competitive enzyme immunoassay (ELISA) using certified commercial test systems (VNIIVSHE, Russia). According to the growth rate, colony pigmentation, acidity reaction, and the morphological traits when grown on a panel of 3 test media, 8 cultures were found to be *P. viridicatum* and 25 cultures were identified as *P. verrucosum*. None of *P. viridicatum* strains formed OA and/or CIT. All strains of *P. verrucosum* produced CIT and some of them OA. In 17 strains implementing the biosynthesis of both metabolites, the accumulation of CIT in the sample on average was about 15 times higher than OA. OA levels above 10 µg/g were detected in only 12 % of producers. The absolute majority (92 %) of *P. verrucosum* strains accumulated CIT in amounts of more than 10 µg/g, of which 48 % of 100 µg/g or more, which allows us to classify them as highly active producers. The data obtained suggest the involvement of the *P. verrucosum* species in co-contamination of OA and CIT of domestic grain products and herbal feeds.

Keywords: *Penicillium verrucosum*, *P. viridicatum*, grain products, herbal feeds, ochratoxin A, citrinin, ELISA.