# 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 видового 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-Локса (ЧЛА), сусловом агаре (СА) и увлажненном зерне риса (ЗР) в течение 7 сут при 23 °C. Содержание стеригматоцистина (СТЕ), эмодина (ЭМО), афлатоксина B<sub>1</sub> (AB<sub>1</sub>), охратоксина А (ОА), микофеноловой кислоты (МФК), циклопиазоновой 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 u 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 — CTE (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 — T-2 токсин и диацетоксисцирпенол 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. tamarii*, *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, райграс, 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 °C. 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 отсевали 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 °C. 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), эмодина (ЭМО), афлатоксина В<sub>1</sub> (АВ<sub>1</sub>), охратоксина А (ОА), микофеноловой кислоты (МФК), циклопиазоновой кислоты (ЦПК), эргоалкалоидов (ЭА), дезоксиниваленола (ДОН) и фумонизинов (ФУМ) в экстрактах определяли методом иммуноферментного анализа с помощью аттестованных тестсистем (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 (Всероссийский НИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии).

Полученные данные анализировали методами описательной статистики в программе Microsoft Excel 2013. В таблицах приведены средние арифметические значения (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	Deer	Частота встре-	
	Вид	чаемости, %	
A. flavus	A. flavus Link	56,3	
	A. tamarii Kita	3,1	
A. niger	A. niger van Tieghem	54,4	
A. versicolor	A. versicolor (Vuill.) Tira-		
	boschi	18,8	
	A. sydowii (Bain. & Sart.)		
	Thom & Church	2,5	
A. glaucus	A. pseudoglaucus Blochwitz	15,6	
	A. amstelodami (Mangin)		
	Thom & Church	10,6	
	A. repens de Bary	1,9	
	A. chevalieri (Mangin)		
	Thom & Church	0,6	
A. ochraceus	A. ochraceus Wilhelm	15,0	
A. wentii	A. wentii Vehmer	14,4	
A. nidulans	A. nidulans Eidam	6,3	
A. candidus	A. candidus Link	4,4	
A. fumigatus	A. fumigatus Fresenius	2,5	
A. terreus	A. terreus Thom	0,7	
Не определена	a <i>Aspergillus</i> spp.	3,8	
Примеча	— н и е. <i>n</i> — число проб, пораж	кенных 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 *А. 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 сусловом агаре (СА). Для токсинообразующих представителей трех видов из исследовательской коллекции при прочих равных условиях (7 сут, 23 °C) нами были испытаны СА, ЧДА и увлажненное зерно риса (3P) (табл. 2). Во всех случаях продуцирование ЦПК (*А. flavus*) и МФК (*А. pseudoglaucus* и *А. repens*) на рисе и ЧДА было сходным, тогда как на СА образование ЦПК изолятами *А. flavus* оказалось гораздо слабее.

2. Токсинообразующая способность изолятов грибов рода *Aspergillus*, выделенных из зерновых кормов на сусловом агаре (CA), агаре Чапека-Докса (ЧДА) и увлажненном зерне риса (3P) (23 °C, 7 сут)

Dur pause (misse messaren)	M	Количество микотоксина, $X\pm s$ нг/г субстрата		
Вид гриба (число изолятов)	Микотоксин	CA	ЧДА	3P
A. flavus (6)	ЦПК	125±28	1410±280	900±165
		$200 \pm 80$	$1780\pm40$	$1710\pm200$
		$330\pm55$	$1190\pm110$	$1055\pm270$
		_	93±15	205±83
		$200 \pm 45$	945±245	$780 \pm 195$
		260±78	810±155	1115±180
A. pseudoglaucus (2)	МФК	не опр.	970±69	1425±95
		не опр.	$775 \pm 46$	1040±56
A. repens (3)	МФК	не опр.	975±155	1145±150
• • • •		не опр.	$1060\pm145$	$1560 \pm 190$
		не опр.	2560±335	$3005\pm920$

 $\Pi$  р и м е ч а н и е. ЦПК — циклопиазоновая кислота, МФК — микофеноловая кислота; 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 *А. niger*, выделенных из кормов и входящих в группу патогенных, способность к образованию анализируемых микотоксинов не была обнаружена, поэтому их не включили в дальнейшее иссле-

дование. Выбор двух ростовых сред для тестирования токсинообразования грибов оказался удачным. На 3Р 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 сусловом агаре (CA) и увлажненном зерне риса (3P) (23 °C, 7 сут)

Рид грибо (и)	Микотоксин (n+)	Количество микотоксина, $X\pm s$ нг/г субстрата		
Вид гриба $(n)$		CA	3P	
A. versicolor (3)	CTE (3)	1060±150	197860±30560	
		160±32	41620±6520	
		4050±810	223960±43310	
A. pseudoglaucus (4)	MΦK (4)	$30320\pm5620$	$21730\pm4340$	
		$1750\pm130$	685±44	
		1840±45	630±75	
		2200±310	940±22	
A. wentii (3)	MΦK (1)	123±22	_	
A. nidulans (3)	CTE (3)	_	$21460\pm4200$	
		_	$9480\pm1830$	
		_	13570±2330	
A. tamarii (5)	ЦПК (5)	_	$3410\pm680$	
		_	1920±255	
		_	$1370\pm105$	
		_	2780±550	
		_	$1760\pm270$	
A. sydowii (3)	ЭМО (2)	_	120±18	
		_	245±45	
A. repens (2)	MΦK (2)	1020±42	480±27	
		810±98	595±80	

 $\overline{\Pi}$  р и м е ч а н и е.  $\overline{\text{CTE}}$  — стеригматоцистин,  $\underline{\Pi}$  К — циклопиазоновая кислота,  $\overline{\text{M}}$  М — микофеноловая кислота,  $\overline{\text{3MO}}$  — эмодин; n — число исследованных изолятов,  $n^+$  — 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), CTE - A. versicolor и A. nidulans,  $M\Phi K - A$ . 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. АВ1 сопутствовал СТЕ у двух изолятов A. versicolor, выращенных на 3P, в следовых концентрациях  $15\pm 3$  и  $14\pm 1$  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 достигало 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, a 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.

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 Zotova E.V. orcid.org/0000-0002-1479-8602 The authors declare no conflict of interests Received February 14, 2017 Piryazeva E.A. orcid.org/0000-0001-5443-3213 Burkin A.A. orcid.org/0000-0002-5674-2818

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. tamarii 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. tamarii 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 allowes 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.

### REFERENCES

- 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. Khmelevskii B.N., Pilipets V.I., Malinovskaya L.S., Kostin V.V., Komarnitskaya N.P., Ivanov V.G. *Profilaktika mikotoksikozov zhivotnykh*. [Prevention of animal mycotoxicosis]. Moscow, 1985 (in Russ.).
- 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.
- Kononenko G.P., Burkin A.A. Mycotoxin contaminations in commercially used hay. Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2014, 4: 120-126 (doi: 10.15389/agrobiology.2014.4.120rus) (in Rus.).
- 8. Kononenko G.P., Burkin A.A. *Uspekhi meditsinskoi mikologii*, 2014, 13: 305-306 (in Russ.).
- 9. Piry azeva 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) (in Engl.).
- 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) (in Engl.).
- 12. Lychagin G.Ya. Sbornik nauchnykh trudov Ryazanskogo SKHI, 1970, 24(2): 56-60 (in Russ.).
- 13. Nazypov M.N. *Uchenye zapiski Kazanskogo veterinarnogo instituta*, 1970, 104: 180-183 (in Russ.).
- 14. Tremasov M.Ya., Ivanov A.V., Sergeichev A.I., Titova V.Yu., Petrova N.V. *Materialy Mezhdunarodnogo simpoziuma «Agroekologicheskaya bezopasnost' v usloviyakh tekhnogeneza»* [Proc. Int. Symp. «Environment-friendly agriculture in the era of thechnogenesis». Part 1]. Kazan', 2006, chast' 1: 358-362 (in Russ.).
- 15. Salikhova N.M. Trudy VNIIVS, 1973, 47: 43-46 (in Russ.).
- 16. Kaloev S.S. Trudy Kubanskogo sel'skokhozyaistvennogo instituta, 1975, 97(125): 3-7 (in Russ.).
- 17. Makarov Yu.A., Gorkovenko N.E. Dal'nevostochnyi agrarnyi vestnik, 2010, 4(16): 32-34 (in Russ.).
- 18. Starchenko L.E. Toksichnye griby na grubykh kormakh i ikh mikologicheskii kontrol' v usloviyakh L'vovskoi oblasti. Avtoreferat kandidatskoi dissertatsii [Toxic fungi Toxic fungi inhabiting coarse feeds and their control in L'vov region]. L'vov. 1967 (in Russ.).
- 19. I v a n o v A.T. Sanitarno-mikologicheskie issledovaniya bobovykh kul'tur v usloviyakh Belorusskoi SSR. Avtoreferat kandidatskoi dissertatsii [Sanitary and mycological study of legumes in Belarussian SSR]. Moscow, 1967 (in Russ.).
- 20. Plauska V.A., Gustas A.P. Trudy Litovskogo NII veterinarii, 1969, 3: 118-125 (in Russ.).
- 21. Lugina Zh.A. Trudy VNIIVS, 1970, 35: 73-79 (in Russ.).
- 22. Lugina Zh.A., Kharatyan A.M. *Izvestiya sel'skokhozyaistvennykh nauk*, 1985, 1: 79-85 (in Russ.).
- 23. Z h a k h a n o v A. Mikotoksikologicheskaya kharakteristika grubykh kormov i osobennosti toksinoobrazovaniya griba Fusarium sporotrichioides Sherb. na yuge Kazakhstana. Avtoreferat kandidatskoi dissertatsii [Mycotoxicology of coarse feeds and Fusarium sporotrichioides Sherb. toxin production in Southern Kazakhstan. PhD Thesis]. Alma-Ata. 1975 (in Russ.).
- 24. Ibragimov R.G. Mikoflora zernofurazha i vegetiruemykh kormovykh zlakov v yuzhnoi chasti Bol'shogo Kavkaza Azerbaidzhana i ikh toksikologicheskaya kharakteristika. Avtoreferat kandidatskoi dissertatsii [Mycoflora of grain forage and green fodder cereals, Big Caucasus, Azerbaijan, and their toxicological characterization. PhD Thesis]. Kiev, 1980 (in Russ.).
- 25. Azimov I.M., Askerov D.A., Ibragimov R.G., Gabiev M.M. V sbornike: *Trudy Azerbaidzhanskogo nauchno-issledovateľ skogo veterinarnogo instituta: Infektsionnye i parazitarnye bolezni zhivotnykh v Azerbaidzhane* [In: Animal infectious and parazirtic diseases in Azerbaijan. Proceedings of Azerbaijan Research Veterinary Institute]. Baku, 1984, 30: 96-100 (in Russ.).
- 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. V sbornike: *Problemy veterinarnoi sanitarii i ekologii* [In: Vetrinary sanitation and ecology challenges. V. 1]. Moscow, 2000, tom 109: 134-144 (in Russ.).
- 28. Burkin A.A., Kononenko G.P., Kislyakova O.S. *Uspekhi meditsinskoi mikologii*, 2003, 1: 122-124 (in Russ.).
- 29. Kononenko G.P., Burkin A.A. *Uspekhi meditsinskoi mikologii*, 2007, 9: 88-89 (in Russ.).
- 30. Burkin A.A., Piryazeva E.A., Kononenko G.P., Malinovskaya L.S. Uspekhi meditsinskoi mikologii, 2006, 7: 94-95 (in Russ.).
- 31. Kononenko G.P., Burkin A.A. Mikologiya i fitopatologiya, 2008, 42(2): 178-184 (in Russ.).
- 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).
- 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, Saarbrucken, 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. Kononenko G.P., Burkin A.A. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*, 2010, 1: 195-196 (in Russ.).
- 38. Vinokurova N.G., Ivanushkina N.E., Khmel'nitskaya I.I., Arinbasarov M.U. Synthesis of α-cyclopiazonic acid by fungi of the genus *Aspergillus. Appl. Biochem. Microbiol.*, 2007, 43(4): 486-489 (doi: 10.1134/S0003683807040138).
- 39. Kononenko G.P., Burkin A.A. Sovremennaya mikologiya v Rossii, 2015, 4(2): 201-203 (in Russ.).