

ТОКСИГЕННОСТЬ ИЗОЛЯТОВ *FUSARIUM SPOROTRICHIOIDES* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ КЛИМАТОГЕОГРАФИЧЕСКОЙ ПРИУРОЧЕННОСТИ

Потехина Р.М.¹, Габдуллина С.Р.², Семёнов Э.И.¹,
Мукминов М.Н.^{2,3}, Никитин О.В.², Шуралев Э.А.^{1,2,3}

¹ Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности (Казань),

² Казанский (Приволжский) федеральный университет (Казань),

³ Казанская государственная медицинская академия (Казань)

Известно, что плесневые грибы с целью уничтожения своих конкурентов (другие виды грибов, бактерии, растения и животные) синтезируют особые вторичные метаболиты – микотоксины, роль которых в жизнедеятельности грибов-продуцентов сводится к главной биологической задаче всех живых существ – выживанию вида [1]. Способность к токсинообразованию заложена в геноме грибов и зачастую является не только видоспецифичной, но и штаммоспецифичной [2]. Наиболее часто встречающиеся в пище людей и кормах для животных грибы, продуцирующие микотоксины, относятся к трем родам: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* [3-4]. Грибы рода *Fusarium* являются наиболее значимыми в глобальном масштабе, чаще всего преобладают в зерне до сбора урожая и могут продуцировать набор различных микотоксинов, наиболее важными из которых являются трихотецены: Т-2 токсин, дезоксиниваленол, а также фумонизины, зеараленон, монилиформин и фузаровая кислота [5]. Различные виды *Fusarium* отличаются выраженной способностью приспосабливаться к изменяющимся условиям существования, что обуславливает возможность их перехода от сапрофитной стадии роста к паразитированию на тканях высших растений, ослабленных вследствие влияния каких-либо факторов окружающей среды [6]. Это приводит к значительным потерям урожая, ухудшению качества зерна и накоплению в нем фузариотоксинов. На посевах и хранящемся зерне злаковых культур наиболее распространены токсигенные виды *F.graminearum* и *F.moniliforme* [3,7].

Одним из представителей многочисленной группы трихотеценовых является Т-2 токсин, обладающий сильнейшим токсическим действием. Основным продуцентом Т-2 токсина является *F.sporotrichioides*, наиболее интенсивное накопление токсинов наблюдается при повышенной влажности и пониженной температуре. Накопление Т-2 токсина в природных условиях связано в основном, с зерном поздней уборки и перезимовавшим в поле. Трихотеценовые микотоксины характеризуются значительным иммунодепрессивным действием, которое проявляется уменьшением хемотаксиса и фагоцитоза различных нейтрофилов и макрофагов [8-9].

Целью данной работы была оценка влияния физических факторов на рост, спорообразование и токсигенность выделенных из трех различных климатогеографических регионов изолятов *Fusarium sporotrichioides*.

Материалы и методы. Микологическое исследование с целью выделения грибов рода *Fusarium* включало первичное выделение грибов из зерна, почв и стеблей растений различных климатогеографических регионов (Марий Эл (Российская Федерация), Республика Казахстан, Республика Замбия) путем их посева на питательную среду Чапека, выделение грибов из первичных посевов в чистые культуры методом непосредственного пересева и их идентификацию. Определение токсигенности изолятов проводили согласно соответствующим общепринятым методическим рекомендациям, утв. РАСХН от 21.03.2010г., токсичность субстрата – по требованиям ГОСТ 31674-2012, методом биотестирования на *Paramecium caudatum*. Определение содержания микотоксинов Т-2 токсина и зеараленона проводили согласно требованиям ГОСТ 28001-88. Обсемененность субстрата микромицетами при искусственной контаминации и различных режимах температуры и влажности (КОЕ/г) определяли по Методическим указаниям по выделению и количественному учету микроскопических грибов в кормах, кормовых добавках и сырье для производства кормов, утв. 14.07.2003 г. Департаментом ветеринарии МСХ РФ

Результаты. Микологическими исследованиями выделено 26 изолятов рода *Fusarium* (7 из Марий Эл, 8 из Казахстана, 11 из Замбии). При этом, изоляты вида *F.sporotrichioides* присутствовали в пробах всех трех регионов. Установлено, что 2 изолята из Марий Эл, 3 из Казахстана, 4 из Замбии – являются токсигенными (зафиксирована гибель парameций при экспозиции 60 мин). В следующих экспериментах с каждого климатогеографического региона использовали по одному токсигенному

изоляту, обладающему достаточно редкой особенностью одновременной продукции Т-2 токсина и зеараленона.

В первом эксперименте изучали влияние температуры и влажности на рост и спорообразование выделенных изолятов микромицетов. Опыт проводили по схеме, разработанной в предыдущих исследованиях [10]. Схема включала: приготовление инокулюма (каждый изолят гриба *F.sporotrichioides* инкубировали при температуре 26°C в течение 12 суток, сеяли на стерильный зерновой субстрат (зерно риса) с влажностью 35% и культивировали в различных температурных и влажностных режимах. Инокулюм представлял собой гомогенную взвесь клеток гриба в 0,01% водном растворе Твин-80 (около 20 тыс. диаспор/мл). Инкубация длилась в течение 30 суток. Затем проводили высевы на питательные среды с подсчетом КОЕ/г субстрата (табл. 1).

Таблица 1. Обсемененность субстрата микромицетами при искусственной контаминации и различных режимах температуры и влажности (КОЕ/г)

Влажность, %	Температура, °С					
	10	15	20	25	30	35
<i>F.sporotrichioides</i> (изолят из Казахстана)						
10	2,4x10 ³	2,3x10 ³	2,5x10 ³	3,1x10 ³	2,4x10 ³	2,0x10 ³
20	2,8x10 ³	3,0x10 ³	6,2x10 ⁵	8,9x10 ⁶	6,6x10 ⁴	7,4x10 ³
40	18,1x10 ³	11,3x10 ⁵	4,9x10⁹	8,2x10¹²	1,7x10 ⁷	4,3x10 ⁴
<i>F.sporotrichioides</i> (изолят из Замбии)						
10	2,0x10 ³	2,1x10 ³	2,8x10 ³	3,1x10 ⁴	1,4x10 ⁴	2,0x10 ³
20	2,1x10 ³	2,4x10 ³	4,1x10 ⁶	5,0x10 ⁷	2,6x10⁹	2,1x10 ⁸
40	3,7x10 ³	8,4x10 ⁴	19,5x10⁹	3,1x10¹⁴	1,1x10¹⁷	5,2x10¹¹
<i>F.sporotrichioides</i> (изолят из Марий Эл)						
10	2,2x10 ³	2,4x10 ³	2,3x10 ³	2,9x10 ³	2,1x10 ³	2,2x10 ³
20	2,6x10 ³	3,3x10 ³	14,8x10 ⁵	7,5x10 ⁶	5,2x10 ³	2,7x10 ³
40	14,7x10 ⁴	3,1x10⁹	3,7x10¹⁰	4,2x10¹³	2,5x10 ⁷	4,1x10 ⁴

Влияние температуры и влажности на загрязненность зерна было подтверждено при искусственном контаминировании грибами *F.sporotrichioides*. Так, для изолятов из Казахстана и Марий Эл наиболее благоприятными условиями были режимы влажности 40 % и температуры 20-25 °С. Для изолята из Замбии диапазон оптимальных температур был шире 20-35 °С. При этом даже при 20%-ной влажности и температуре 30 °С отмечалось интенсивное обсеменение субстрата грибом, что предположительно связано с климатогеографическими особенностями региона, к которым адаптирован данный штамм (изолят) [11].

Таблица 2. Уровень содержания микотоксинов в субстрате (мг/кг) после культивирования изолятов *F.sporotrichioides* при разных температурных режимах

Микотоксин	Температурный режим культивирования		
	3 сут при 28°C, 11 сут при 25°C, 14 сут при 4°C;	3 сут при 28°C, 11 сут при 25°C, 14 сут при 18°C	28 сут при 25°C
<i>F.sporotrichioides</i> (изолят из Казахстана)			
Т-2 токсин	13,24	8,82	1,44
зеараленон	1,72	18,46	6,63
<i>F.sporotrichioides</i> (изолят из Марий Эл)			
Т-2 токсин	1,23	1,76	0,34
зеараленон	1,45	2,34	1,15
<i>F.sporotrichioides</i> (изолят из Замбии)			
Т-2 токсин	0,13	1,74	3,27
зеараленон	0,97	5,25	1,92

Эволюционно микотоксины вырабатываются как фактор защиты и нападения. Поэтому логично оценить токсинообразование при воздействии стресс-факторов, которые могут активировать или наоборот подавить токсинообразование. В связи с этим во втором эксперименте определяли влияние температурного стресс-фактора на токсинообразование выделенных изолятов микромицетов. Исследование проводили согласно описанной ранее схеме [10]. Схема включала: приготовление инокулюма (3 выделенных изолята вида *F.sporotrichioides*) и стационарное культивирование в течение 4 недель в трех режимах: 4, 18 и 25 °С (табл. 2). Содержание микотоксинов (Т-2 токсин, зеараленон) определяли методом тонкослойной хроматографии, результаты которой представлены в таблице 2.

Установили, что токсигенность микромицетов изменяется под действием температурных стресс-факторов, что проявляется в усилении или ослаблении выработки микотоксинов. При влажности субстрата 40 % для казахстанского изолята выявлено наибольшее содержание Т-2 токсина при низкой температуре 4 °С; для марийского – при 18 °С, что не коррелирует с оптимальными условиями для развития гриба и не зависит от роста фунгальной массы; а для замбийского изолята – при 25 °С, что совпадает с оптимальными условиями, установленными в первом эксперименте данной работы. Наибольшее продуцирование зеараленона всеми изолятами установлено при 18 °С.

Заключение. Наиболее оптимальными условиями для роста грибов являются температура 20-25 °С при влажности 35-40%. Установлено, что при высокой влажности (> 20%) развитие грибов и степень заспоренности в зерне наблюдается в более широких интервалах температуры. Токсигенность микромицетов изменяется под действием температурных стресс-факторов, что проявляется в усилении или ослаблении выработки микотоксинов и может не совпадать с оптимальными условиями для развития гриба, к которым он адаптирован в климатогеографическом регионе происхождения.

Литература

1. Иванов А.В., Фисинин В.И., Тремасов М.Я., Папуниди К.Х. Микотоксины (в пищевой цепи). – Москва: ФГБНУ «Росинформагротех», 2012. – 136 с.
2. Ндайишимийе Э.В., Хаммадов Н.И., Осянин К.А., Фаизов Т.Х., Шуралев Э.А., Мукминов М.Н. Биоинформационный анализ олигонуклеотидов для молекулярно-генетической индикации возбудителей аспергиллеза и аскофероза пчел / Ветеринарный врач. – 2015. – № 2. – С. 3-9.
3. Семенова С.А., Потехина Р.М., Семенов Э.И., Валиев А.Р., Мишина Н.Н., Хусаинов И.Т. Оценка токсичности кормов по регионам Российской Федерации / Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2015. – № 224. – С. 196-199.
4. Семёнов Э.И., Потехина Р.М., Габдуллина С.Р., Семёнова С.А., Шуралев Э.А., Тремасов М.Я. Загрязненность продовольственного сырья грибом *Aspergillus fumigatus* / Успехи медицинской микологии. – 2016. – № 16. – С. 225-227.
5. Семёнов Э.И. Сочетанное воздействие Т-2 токсина, дезоксиниваленола и зеараленона / Успехи медицинской микологии. – 2015. – Т.14, №14. – С. 302-306.
6. Беляева Л.Л., Танасева С.А. Условия роста мицелиальных грибов и биосинтез микотоксинов / Научный медицинский вестник. – 2015. – №1(1). – С. 45-60.
7. Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Левитин М.М., Новожилова К.В. Фузариоз зерновых культур / Защита и карантин растений. – 2011. – № S5. – С. 69-120.
8. Валиуллин Л.Р., Хайруллин Д.Д., Семенов Э.И., Егоров В.И., Шуралев Э.А., Рагинов И.С. Комбинированное воздействие микотоксинов на физиологические показатели крыс / Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2015. – Т.221, №1. – С. 45-48.
9. Семенов Э.И., Дорожкин В.И., Тремасов М.Я., Канарский А.В. Перекисное окисление липидов при Т-2 токсикозе и применении полисахаридного адсорбента / Успехи медицинской микологии. – 2015. – Т.14, №14. – С. 307-309.
10. Токарев С.В., Кононенко Г.П., Соболева Н.А., Буркин А.А. Токсинообразование у популяций *Fusarium roae*, поражающих зерно хлебных злаков в Уральском и Западно-Сибирском регионах / Сельскохозяйственная биология. – 2009. – №1. – С. 89-92.
11. Мукминов М.Н., Никитин О.В., Ндайишимийе Э.В., Шуралев Э.А. Оценка перспектив развития пчеловодства в Южной провинции Замбии / Ветеринария. – 2015. – № 10. – С. 49-52.