

УДК 619:591.145.2.582.28

ПОЛЕВЫЕ ИЗОЛЯТЫ РОДА *FUSARIUM SPOROTRICHIOIDES* ПРОДУЦИРУЮЩИЕ Т-2 И ЗЕАРАЛЕНОН

Р.М. Потехина, к. биол. н., А.Р. Валиев, к. биол. н., Н.Н. Мишина, к. биол. н., Ю.В. Ларина, к. биол.н., Р.В. Нефедова, к. биол.н., В.Ю. Титова, к.биол.н, ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»

Ключевые слова: токсины, метаболиты, мицелиальные грибы, полевые изоляты, контаминация. **Key words:** toxins, metabolites, filamentous fungi, field isolates, contamination.

РЕФЕРАТ



По оценке ФАО ВОЗ за последние годы стоимость ежегодных потерь урожая от заражения культурных растений токсинообразующими грибами, загрязнения урожая микотоксинами, снижения продуктивности и падежа сельскохозяйственных животных, потребляющих загрязненные корма, составляет несколько млрд. долларов в год.

Распространение мицелиальных грибов рода *Fusarium* является весьма опасным плесневым микромицетом. Плесневый изолят рода *Fusarium* может проявлять себя во всех климатических сферах. Гриб способен поражать сосудистую систему растений, овощных культур, проросших зерен, корней деревьев. При поражении тканей грибами рода *Fusarium* растения, как правило, увядают и начинают гнить. Споры и частички мицелия гриба могут длительное время локализоваться на поверхности почв, в воде, в растительных остатках поражая неокрепшие саженцы зерновых и сельскохозяйственных культур. Повышенная влажность, недостаток светового дня и перепады температур благотворно влияют на токсинообразование грибов рода *Fusarium*. В качестве эксперимента были отобраны почвенные изоляты фитопатогенных грибов рода *Fusarium* (*Fusarium sporotrichioides*) выделенных из почвенного субстрата, который образовывал Т-2 токсин и зеараленон.

Культуру изолятов выделяли методом серийных разведений и отбором единичных мицелиальных колоний.

Идентификация полевых изолятов проводили микроскопированием препарата с помощью атласов определителей. Стерильный зерновой субстрат контаминировали с полевым изолятом который подвергался температурным колебаниям, искусственно создавая стресс для микромицета. Визуально фиксировали заспоренность, рост, пигментацию мицелия на разных видах зерновых культур. Но 3 сутки зараженного зерна полевым изолятом добавляли водные суспензии с лактозой, манит, диметилсульфатид для улучшения ростовых качеств и токсинообразования.

Целью работы являлось провести анализ на предмет возможности изучения полевого изолята рода *Fusarium* (*Fusarium sporotrichioides*) в дополнении со вспомогательными водными растворами лактозой, манит, диметилсульфатид которые влияли на получении Т-2 токсина и зеараленона.

ВВЕДЕНИЕ

Микотоксины в кормах – это группа высокотоксичных химических веществ, вторичных метаболитов жизнедеятельности плесневых грибов.

По степени биологической опасности микотоксины стоят на втором месте по-

сле химических пестицидов [3, 7]. Серьезным заболеванием во всех странах является плесневые грибы рода *Fusarium*, которые приспосабливаются к различным погодно-климатическим условиям, причем увеличение частоты и амплитуды погодных аномалий способствует массо-

вому размножению патогенов и повышению токсиногенности [4,6]. Ежегодно в городах мегаполисах в атмосферу выбрасывается более 100000 тонн вредных выбросов. Проявления новых форм интоксикации микотоксигенной природы способствуют возникновению очагов новых симбиотических заболеваний (лейкоэнцефаломалация лошадей, отек легких у свиней), участились случаи ухудшения иммунитета у людей с хроническими и аллергическими заболеваниями.

Поражая растения зерновых культур, мицелиарные фитопатогены развиваются от корневой шейки вверх по стеблю культуры, захватывая сосудистую систему растительного организма [2]. Погибшие растения являются хорошим резервуаром для образования спор и мицелия гриба.

В настоящее время *Fusarium sporotrichioides* рассматривают в качестве основных продуцентов Т-2 токсина и зеараленона, способных в значительной степени загрязнять зерновую продукцию этим микотоксином [1,5]. Токсины, продуцируемые грибами вида *Fusarium* обладают мутагенными и канцерогенными свойствами и представляют огромную угрозу для сельскохозяйственных животных, птиц и человека.

Микотоксины воздействуют практически на все органы и системы организма, но главным образом затрагивают желудочно-кишечный тракт, печень почки, селезенку, эндокринную и репродуктивную систему, а также головной мозг и нервную систему. Контаминируя продукты животноводства (молоко, яйца, мясо) и растениеводства, могут представлять опасность для здоровья человека.

Анализ зарубежных ученых за последние 15 лет показал, что в мире не существует высокоустойчивых сортов к поражению изолятами грибов рода *Fusarium*. Высокоустойчивость к фузариозным заболеваниям вызывают особую опасность распространения токсинов таких как: Т-2 токсин, дезоксиниваленол (ДОН), диацетоксисцирпенол (ДАС), зеараленон (Ф-2). Токсины гриба, как правило, локализуются и накапливаются в зародыше зерна,

что пагубно влияет и ускоряет процессы вырождения зародышевой плазмы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выделения мицелия грибов рода *Fusarium* готовили разведения почвенной суспензии внесенной в количестве 1 грамма влажного образца почвы в 10 мл автоклавированной воды с температурой 230С с последующим взбалтыванием на шутель-апарате в течение 10 минут при 160 об/мин. После взбалтывания готовили 10-кратные разведения полученной суспензии. Серийные разведения готовили 1:10, 1:100, 1:1000. С каждого разведения по 1 мл взвесь переносили на агаризированную среду Чапека с добавлением медицинской желчи, для подавления сопутствующей микрофлоры. Питательная среда Чапека с желчью в состав которой входит сахара – 30 г; натрий азотнокислый – 2 г; калий фосфорнокислый однозамещенный – 1 г; магний сернокислый – 0,5 г; калий хлористый – 0,5 г; железо сернокислое закисное – 0,01 г; желчь медицинская – 100 мл; вода дистиллированная – 1000 мл; агар-агар – 25 г; pH 5,0-5,5. Почвенные образцы инкубировали при температуре 250 С в течение 7-8 суток.

Из пораженного зерна, растений и овощей исследовали субэпидермальную микробиоту на наличие особо опасных грибов рода *Fusarium*. Предварительно проводили дезинфекцию 3% раствором формалина, зерна заворачивали в марлевую салфетку, размером 10x10 см, и помещали в химический стаканчик на 1,5 минуты, учитывая стерильность и погруженность зерен. Для дальнейшей нейтрализации формалина промывали стерильной водой с добавлением 4 мл 5%-ного раствора аммиака. Обработанные зерна параллельно по часовой стрелке выкладывали на чашки Петри с помощью пинцета на агаризированную среду Чапека. Для выделения чистой культуры грибов рода *Fusarium* применяли метод непосредственного пересева выросших изолятов. При помощи микологического крючка мицелий со спорами перемещали на поверхность агаризированной питательной среды картофельно-глюкозного агара и на

среду Чапека, инкубировали как описано выше, далее проводили идентификацию выросшей культуры гриба по атласам определителям. Готовили препарат для микроскопирования. Частицы мицелия со спороношением, взятые препаровальной иглой из чашки, помещали на предметное стекло и добавляли каплю фиксирующей жидкости (лактофенол Аммана: дистиллированная вода 1 часть, молочная кислота 1 часть, глицерин 2 части, фенол 1 часть). Покрывали препарат покровным стеклом и проводили микроскопическое исследование при увеличении $\times 10$ и $\times 40$. Идентификацию грибов проводили по морфологическим признакам, сопоставляя с фотоколлекцией грибов. Содержание токсинов и метаболитов в полевых изолятах определяли методом тонкослойной хроматографии ГОСТ 28001-88.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в ФГБНУ «ФЦТРБ ВНИВИ» в лаборатории микотоксинов. Из коллекций полевых изолятов рода *Fusarium* отобран микромицет, который проявлял активность в образовании Т-2 токсина и зеараленона. Плесневые грибы были выделены с почвенных субстратов, с зерновых и овощных сельскохозяйственных культур. Изолят грибов рода *Fusarium* (*Fusarium sporotrichi-*

oides) культивировался на картофельно-глюкозном агаре и на голодной среде Чапека. На рисунке 1 и 2 показан рост 7 суточной культуры гриба *Fusarium sporotrichioides* на картофельно-глюкозном агаре. Морфологические признаки почвенного изолята колонии – быстрорастущие, обильный воздушный мицелий, конидиеносцы разветвленные. Микроконидии многочисленные, грушевидные, овальные, с остроконечием, 0-1 перегородки. Макроконидии веретеновидные-серповидные с постепенно сужающейся верхней клеткой, с четко выраженной ножкой у основания, воздушный мицелий до 3-х перегородок.

Для заражения мицелием гриба *Fusarium sporotrichioides* готовили смесь в равных пропорциях по 50 граммов каждой зерновой культуры. В химические колбы объемом 200 мл насыпали зерно в нескольких вариантах: пшеница и просо, рис и пшено, кукуруза и рис. Зерно подвергали термической обработке (автоклавированием) при 1,5 А в течение 40 минут, для подавления сопутствующей микрофлоры в зерновых культурах. На третьи сутки для ускорения роста мицелия и спор делали водные разведения с концентрацией лактозы, манита на бульоне Сабуро и с добавлением кипяченной воды. Морфологические признаки почвенного изолята колонии – быстрорастущие, обильный воздушный мицелий, ко-



Рис. 1. Рост 7 сут. колоний изолята *Fusarium sporotrichioides* на картофельно-глюкозном агаре

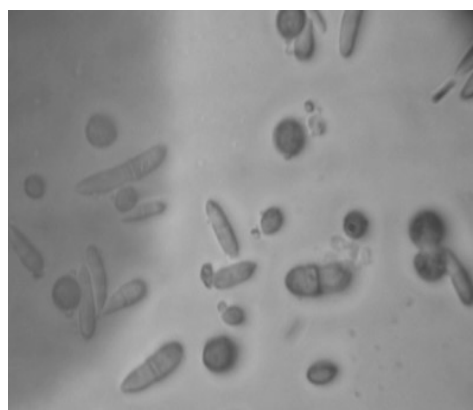


Рис. 2. Многочисленные макроконидии, грушевидные, овальные с остроконечной 1 перегородкой.

Таблица 1

Морфологические изменения гриба *Fusarium sporotrichioides*

Гриб <i>Fusarium sporotrichioides</i> экспозиция 30 суток температурный режим +8					
Наименование пробы	Количество зерна в закладке	Цвет инокулятов	Цвет экстракта выпарительных чашек	T-2, мг/кг разведение/доза	Зеараленон разведение/доза мкл
F. sporotrichioides с добавлением ДМСО+ лактоза	50 г кукуруза+ рис	колонии белого цвета, мицелий пушистый	желто-коричневый цвет экстракта	1 разведение 6000/5 мкл 34мг/кг 2 разведение 5000/5 мкл 24мг/кг	1000/10 мкл
F. sporotrichioides обычный посев с водопроводной водой	50 г пшеница +просо	темно-коричневый цвет колоний	темно-красный цвет экстракта	1 разведение 1000/5 мкл 7мг/кг 1000/5 мкл 9,6 мг/кг	1000/10 мкл
F. sporotrichioides экстракт с добавлением бульона на лактозе	50г рис+ пшено	колонии красные с розовыми включениями	светло-коричневый цвет колоний	1 разведение 6000/5 мкл 48 мг/кг 2 разведение 5000/5 мкл 48мг/кг	1000/10 мкл
F. sporotrichioides обычная водопроводная вода	50г пшено	колонии светло-коричневого цвета с розовыми включениями, местами мицелий белый, пушистый	красно-коричневого цвета экстракт	1 разведение 1000/10 мкл 5 мг/кг 2 разведение 2000/5 мкл 24 мг/кг	2000/10 мкл
F. sporotrichioides экстракт с добавлением крахмала и манита	50г кукуруза	цвет колоний белый, мицелий паутинистопушистый	цвет экстракта желто-коричневый	1 разведение 1000/10 мкл 10 мг/кг 2 разведение 2000/5 мкл 9,6 мг/кг	1000/10 мкл

нидиеносцы разветвлённые. Микроконидии многочисленные, грушевидные, овальные, с остроконечием, 0-1 перегородки. Макроконидии веретеновидны - серповидные с постепенно сужающейся верхней клеткой, с четко выраженной ножкой у основания, воздушный мицелий до 3-х перегородок.

Для заражения мицелием гриба *Fusarium sporotrichioides* готовили смесь в равных пропорциях по 50 граммов каждой зерновой культуры. В химические колбы объемом 200 мл насыпали зерно в нескольких вариантах: пшеница и просо, рис и пшено, кукуруза и рис. Зерно подвергали термической обработке

Таблица 2

**Морфологические изменения гриба *Fusarium sporotrichioides*
под влиянием температурного стресса**

Гриб <i>Fusarium sporotrichioides</i> экспозиция 30 суток температурный режим: 23°С, 60°С, 4°С					
Наименование пробы	Количество зерна в закладке	Цвет инокулятов	Цвет экстракта выпарительных чашек	Т-2, мг/кг разведение/доза	Зеараленон разведение/доза мкл
<i>F.sporotrichioides</i> с добавлением ДМСО+ лактоза	50 г кукурузы	колонии белого цвета, мицелий паутинно-пушистый	розовато-коричневый цвет экстракта	1 разведение 7000/5 мкл 448 мг/кг 2 разведение 10000/5 мкл 360,6 мг/кг	2000/10 мкл
<i>F.sporotrichioides</i> обычный посев с водопроводной водой	50 г пшеница +просо	темно-коричневый цвет колоний	темно-красный цвет экстракта	1 разведение 6000/5 мкл 120 мг/кг 2 разведение 10000/5 мкл 240 мг/кг	1000/10 мкл
<i>F.sporotrichioides</i> экстракт с добавлением бульона на лактозе	50г рис+пшено	колонии красноватого цвета	светло-коричневый цвет колоний	1 разведение 7000/5 мкл 448 мг/кг 2 разведение 10000/5 мкл 240,6 мг/кг	1000/10 мкл
<i>F.sporotrichioides</i> обычная водопроводная вода	50г пшено	колонии розового цвета, мицелий белый, пушистый	темно-коричневого цвета экстракт	1 разведение 6000/5 мкл 72 мг/кг 2 разведение 8000/5 мкл 141 мг/кг	2000/10 мкл
<i>F.sporotrichioides</i> экстракт с добавлением крахмала и манита	50г кукуруза	цвет колоний белый, мицелий паутинисто-пушистый	цвет экстракта светло-коричневый	1 разведение 6000/5 мкл 159 мг/кг 2 разведение 10000/5 мкл 176 мг/кг	1000/10 мкл

(автоклавированием) при 1,5 А в течение 40 минут, для подавление сопутствующей микрофлоры в зерновых культурах. На третьи сутки для ускорения роста мицелия и спор делали водные разведения с концентрацией лактозы, манита на бульоне Сабуро и с добавлением кипяченной воды. Проведенный табличный анализ показывает, что инокулят гриба *F. sporotrichioides* хранившийся при температуре +8 при разных зерновых субстратах менял цвет колоний изолята. Мицелий выращенный на кукурузе при добавлении крахмала и манита становится более паутинистым и пушистым. При выращивании инокулята на пшене с добавлением водопроводной воды колонии имеют вид светло-коричневого цвета с характерными оттенками для *F. sporotrichioides*.

Наличие токсинообразования Т-2 и зеараленона определяли при помощи тонкослойной хроматографии.

Из данных таблиц видно, при добавлении ДМСО и лактозы получен максимальный результат: в первом разведении 6000/5 мкл, это составляет 34мг/кг, а зеараленона 1000/10 мкл. В обычном случае при экстрагировании инокулята автоклавированной водой, показатель Т-2 в составил 1000/10 мкл. 10 мг/кг, что меньше на 5%, а показатель зеараленона был одинаковый 1000/10 мкл. По данным анализа исключение составило повышенное количество зеараленона культивированного на пшене что составило 2000/10 мкл.

Во втором случае инокулят с колбами зараженного зерна изолятом *Fusarium sporotrichioides* по истечении 15 сут. роста мицелия при температуре 230 С подвергался температурному стрессу. Колбы нагревали до 60°C и после охлаждения оставляли в холодильнике на 15 сут. при температуре +4° С. Из данных таблиц видно, что воздействие температурного стресса *F. sporotrichioides* подвергался визуальному изменению микромицета, способствовал увеличению выработки Т-2 токсина и зеараленона. При первой экстракции изолята *F. sporotrichioides* с добавлением ДМСО+ лактоза обычном температурном режиме +80 С выработка

Т-2 токсина составила 1 разведение 6000/5 мкл, 34мг/кг, при стрессовом температурном режиме 21 0 С выращенного инокулятов в течении 15 дней, затем 60°C и +4° С получили повышенное содержание Т-2 токсина в 1 разведение 7000/5 мкл, 448 мг/кг. При применении обычной водопроводной воды пшено контаминированное изолятом *F. sporotrichioides* вырабатывало меньше Т-2 токсина 1 разведение 6000/5 мкл, 72 мг/кг, но зеараленон был выше, чем в других колбах 2000/10 мкл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно сделать вывод, что стресс температурного режима и добавление питательных элементов для почвенных изолятов, а особенно для грибов рода *Fusarium* (*Fusarium sporotrichioides*) положительно влияет для выработки Т-2 токсина и зеараленона. Для роста и необходимых жизненных функций фитопатогенных изолятов важен и зерновой субстрат, на наличие клейковины в зерне и крахмала, солей и микро макро элементов. Для грибов рода *Fusarium* кукурузная культура и рис могут являться одним из важных питательных субстратов для устойчивого поражения фузариозной инфекции.

Experimental obtaining of t-2 toxin and their metabolites from field isolates of fusarium fungi. R.M. Potekhina, Ph.D. Biol. Sci., A.R. Valiev, Ph.D. Biol. Sci., N.N. Mishina, Ph.D. Biol. Sci., Yu.V. Larina, PhD in Biology, R.V. Nefedova, V.Yu. Titova, PhD in Biology, Candidate of Biological Sciences, Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety".

ABSTRACT

The widespread occurrence of filamentous fungi of the genus *Fusarium* is a very dangerous mold micromycete. Mold isolate of the genus *Fusarium* can manifest itself in all climatic areas. The micellar fungus is capable of infecting the vascular system of plants, germinated grains, tree roots, and vegetable crops. When tissues are damaged by fungi of the genus *Fusarium*, plants, as a rule, wilt and begin to rot. Spores and parti-

cles of mycelium of the fungus can be localized for a long time on the surface of the soil, in water, in plant residues, affecting immature seedlings of grain and agricultural crops. High humidity, lack of daylight hours and temperature drops have a beneficial effect on the toxin formation of fungi of the genus *Fusarium*. As an experiment, soil isolates of fungi of the genus *Fusarium* (*Fusarium sporotrichioides*) showing the toxin formation of T-2 toxin were selected. The prepared grain substrate was contaminated with field isolate and exposed to temperature fluctuations, artificially creating stress for the micromycete. The weediness, growth, and color of mold on different types of grain crops were visually recorded. In addition, suspensions with lactose, becton, and dimethyl sulfoxide were added to the extract to improve growth and toxin formation. The aim of this work was to study an isolate of the genus *Fusarium* (*Fusarium sporotrichioides*) in obtaining T-2 toxin, use for laboratory purposes as a test object and to replenish the collection of microorganisms.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилова, О.П. Продуценты Т-2 токсина – незнакомые знакомцы из рода *Fusarium* / О.П. Гаврилова, Т.Ю. Гачкаева // Успехи медицинской микологии. – 2018. – Т.19. – С. 304-308.
2. Коломиец, Т.М. Токсинообразование грибов рода *Fusarium* на посевах зерновых культур в России / Т.М. Коломиец, М.И. Киселева, Н.С. Жемчужина // Успехи медицинской микологии. – 2016. – Т.16. – С. 204-205.
3. Монастырский, О.А. Микотоксины – глобальная проблема безопасности продуктов питания и кормов / О.А. Монастырский // Агрохимия. – 2016. – №6. – С. 67-71.
- 4.4. Потехина, Р.М. Исследования полевого изолята *Fusarium sporotrichioides* RM+ / Р.М. Потехина // Ветеринарный врач. – 2020. – №4. – С. 31-37.
- 5.5. Bondarenko, S.A. Alkalitolerant micromycetes in acidic and neutral soils of the temperate zone / S.A. Bondarenko, M.L. Georgieva, E.N. Bilanenko // Microbiology. – 2016. – Т. 85. – №. 6. – P. 737-744.
- 6.6. Marfenina, O. E. The structure of fungal biomass and diversity of cultivated micromycetes in Antarctic soils (Progress and Russkaya stations) / O. E. Marfenina, D. A. Nikitin, A. E. Ivanova // Eurasian Soil Science. – 2016. – Т. 49. – №. 8. – P. 934-941.
- 7.7. Yumangulova, G.M. Effect of abiotic stressors on T-2-producing environmental isolates of *Fusarium sporotrichioides* / G.M. Yumangulova, E.I. Semenov, R.M. Potekhina, M.N. Mukminov, E.A. Shuralev // Journal of Pharmacy Research. – 2017. – 11(10). – P. 1226-1229.