

ХЕМО- И ФЕНОТИПЫ ПОТЕНЦИАЛЬНО ТОКСИГЕННОГО ГРИБА *ASPERGILLUS FLAVUS*

© 2022 г. Г. П. Кононенко^{1,*}, Е. А. Пирязева^{1,**}, Е. В. Зотова^{1,***}, А. А. Буркин^{1,****}

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии ФНЦ ВИЭВ РАН,
123022 Москва, Россия

*e-mail: kononenkogp@mail.ru

**e-mail: piryazeva01@yandex.ru

***e-mail: ezotova63@gmail.com

****e-mail: aaburkin@mail.ru

Поступила в редакцию 15.02.2022 г.

После доработки 22.03.2022 г.

Принята к публикации 07.05.2022 г.

В последние годы при изучении биохимических и физиологических характеристик микромицета *Aspergillus flavus* особое внимание уделяется неоднородности его токсигенного потенциала и морфологических признаков. Во многих регионах мира для популяций, ассоциированных с агропродукцией, описаны различия в соотношении хемотипов и выявлены признаки соответствия степени токсигенности и размеров склероциев. В работе впервые проведена сравнительная оценка токсинообразования и фенотипического статуса *A. flavus* из состава микобиоты российского зерна, продуктов его переработки и зерновых смесей. Определение афлатоксина В₁ (АВ₁), стеригматоцистина (СТЕ), циклопиазоновой кислоты (ЦПК) в образцах биомассы, полученных после 7-суточного культивирования изолятов на суловом агаре при 25°C, проводили методом непрямого конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа. В выборке из 98 культур были представлены в основном нетоксигенные формы (46 изолятов) и продуценты ЦПК (50 изолятов), у которых накопление токсина в среднем составляло 165 нг/г субстрата, варьировало от 20 до 468 и лишь в одном случае было равным 1350 нг/г. У двух изолятов в малых количествах были детектированы АВ₁ (1 и 2 нг/г) и ЦПК (25 и 30 нг/г) совместно. Продуценты СТЕ, как и изоляты, способные образовывать исключительно АВ₁, не были найдены. Процесс образования склероциев на субстрате с овощными соками (аналоге агара “5/2”) наблюдался чаще и завершался за 10 сут, в то время как на агаре Чапека с добавлением 3%-го нитрата натрия в отдельных случаях мог занимать до 20 сут. Было показано, что все 78 культур *A. flavus* относились к L-типу с крупными склероциями (диаметром более 400 мкм). Слабому потенциалу токсинообразования популяции соответствовал однородный фенотипический состав.

Ключевые слова: афлатоксин В₁, иммуноферментный анализ, размеры склероциев, стеригматоцистин, циклопиазоновая кислота, *Aspergillus flavus*

DOI: 10.31857/S0026364822040055

ВВЕДЕНИЕ

Микромицет *Aspergillus flavus* Link, часто встречающийся контаминант агропродукции, обладает способностью к продуцированию обширной группы токсичных метаболитов (Frisvad et al., 2019), в которой особое место принадлежит афлатоксинам (Klich, 2007) и циклопиазоновой кислоте (Chang et al., 2009; Ostry et al., 2018). У изолятов этого гриба были выявлены отличия по интенсивности продуцирования афлатоксинов, а также по числу и размерам образуемых склероциев — многочисленных мелких ($d < 400$ мкм) или крупных ($d > 400$ мкм), обозначенных как S- и L-морфотипы. По первым оценкам, S-форма обеспечивала интенсивное накопление афлатоксинов, а L-фор-

ма чаще всего была менее токсигенной (Wang et al., 1993). В наши дни связь между процессами биосинтеза вторичных метаболитов и образованием склероциев уже доказана на генном уровне (Calvo, Cary, 2015). Современные исследователи при описании природных популяций, наряду с оценкой морфологической изменчивости, дифференцируют до пяти хемотипов этого гриба и среди них — образующие отдельно и совместно афлатоксины В и G групп, циклопиазоновую кислоту, а также нетоксигенные формы (Vaamonde et al., 2003; Razzaghi-Abyaneh et al., 2006; Chang et al., 2009). На популяционном уровне исследований по способности грибов рода к биосинтезу циклопиазоновой кислоты недостаточно (Vaamonde et al., 2003; Pildain et al., 2004), в нашей

Таблица 1. Объекты, использованные для выделения культур *Aspergillus flavus*

Группа объектов	Наименование	Число образцов
Зерно	пшеница	12
	ячмень	8
	кукуруза	8
	овес	4
	горох	2
	просо	1
Продукты переработки зерна	подсолнечный жмых и шрот	14
	соевый жмых и шрот	5
	белковые добавки	7
	мучка соевая	2
	отруби	1

стране подобные проекты не проводились, были тестированы лишь отдельные группы и виды рода *Aspergillus* (Burkin et al., 2006; Kononenko, Burkin, 2008).

Целью работы стала оценка популяции гриба *Aspergillus flavus*, ассоциированной с зерновыми объектами, по характеру токсинообразования и размерам образуемых склероциев.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры *A. flavus* выделяли из 92 образцов зерновой продукции – зерна (35 образцов), продуктов его переработки (29 образцов) (табл. 1) и зерновых смесей (28 образцов), направленных для микотоксикологического анализа в разные годы агропромышленными предприятиями центральных областей Европейской части России (табл. 1).

Посевы серийных разведений водных взвесей измельченного материала выполняли в чашках Петри на агаре Чапека–Докса (ЧДА), содержащего 10% медицинской консервированной желчи и антибиотики (50 тыс. единиц действия – ЕД – пенициллина и 100 тыс. ЕД стрептомицина на 1 л среды). Далее колонии, предположительно отнесенные к виду *A. flavus*, высевали на чашки Петри с ЧДА и антибиотиками, а затем, после подтверждения их чистоты, – на пробирки со скошенным ЧДА (Piryazeva, Malinovskaya, 2013). Видовую идентификацию чистых культур проводили по определителю (Raper, Fennel, 1965). Выборку для дальнейших исследований формировали по принципу “1 изолят – 1 образец”, при этом из шести

образцов (зерно пшеницы, зерно ячменя, соевый шрот и три зерносмеси) было взято по 2 изолята из-за замеченных особенностей в структуре колоний при осмотре первичных посевов.

Для оценки токсинообразования инокулюм, 10-суточные культуры грибов на ЧДА, помещали во флаконы вместимостью 10 мл и диаметром дна около 18 мм, каждый из которых содержал по 1.5 мл сусового агара (wort agar, Liofilchem®, Italy). Флаконы закрывали ватно-марлевыми пробками и слоем лабораторной пленки Parafilm M. После инкубации в темноте в течение семи суток при 25°C в каждый флакон добавляли по 1.5 мл смеси ацетонитрил – вода в объемном соотношении 84 : 16 и дважды с 16-часовым интервалом интенсивно встряхивали содержимое. Экстракты после 10-кратного разведения буферным раствором анализировали на содержание афлатоксина В₁ (АВ₁), стеригматоцистина (СТЕ) и циклопиазоновой кислоты (ЦПК) с помощью трех аттестованных тест-систем для непрямого конкурентного иммуноферментного анализа (Burkin et al., 2000; Kononenko et al., 2003; Kononenko, Burkin, 2008), нижние пределы количественных измерений соответствовали 85% уровню связывания антител. Результаты выражали как средние арифметические значения (*M*) со стандартной ошибкой среднего (\pm SEM) и как минимальные – средние – максимальные показатели для групп изолятов и общей выборки.

Для получения склероциев использовали агар Чапека, содержащий 3% нитрата натрия, и 2%-й агар с 5%-й добавкой овощных соков “5/2 agar”, pH 5.2 (Cotty, 1989) в виде аналога, приготовленного на основе мульти-сока “J-7 Тонус Фитнес” (ООО “Лебедянский”, Россия). В чашки Петри диаметром 90 мм вносили по 35 мл вышеуказанных сред, поверхность засеивали 10-суточными культурами, выращенными на ЧДА, инкубировали в темноте при температуре 31°C и через пять суток ежедневно контролировали на наличие склероциев. По окончании эксперимента штаммы классифицировали как S-тип (диаметр <400 мкм), L-тип (диаметр >400 мкм) и NS-тип (не образующий склероции) по ранее предложенной шкале (Cotty, 1989). Оценку диаметра склероциев проводили с помощью микроскопа Nikon Eclipse E200 (Nikon, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изоляты *A. flavus*, полученные из всех объектов, при культивировании на ЧДА образовывали быстрорастущие колонии с обильным спороношением различных оттенков желто-зеленого цвета, у которых наблюдалась значительная изменчивость по двум признакам – объему воздушного мицелия (от обильного до крайне слабого) и окрашиванию обратной стороны (от почти полного его отсутствия до розовато-коричневых тонов).

Таблица 2. Хемотипы изолятов *Aspergillus flavus* (сусловый агар, 7 сут, 25°C)

Объект	Число изолятов	Распределение по хемотипам		
		AB ₁ +/ЦПК+	AB ₁ -/ЦПК+	AB ₁ -/ЦПК-
Зерно	37	1, (2/30)	19, -(30–148–447)	17
Продукты переработки зерна	30	1, (1/25)	15, -(20–134–468)	14
Зерносмеси	31	–	16, -(22–214–1350)	15
Суммарно	98	2	50, -(20–165–1350), в их числе: 22, (20–40–60) 18, (108–156–200) 9, (245–400–468) 1 (1350)	46

Примечание. AB₁ – афлатоксин B₁; ЦПК – циклопиазеновая кислота; в скобках указано количество микотоксина (нг/г субстрата, конкретное значение или минимальное – среднее – максимальное значение).

Эксперимент по оценке токсинообразования показал, что около половины изолятов не способны образовывать AB₁ и ЦПК, а другие продуцируют ЦПК (табл. 2). Только два изолята, наряду с ЦПК, образовывали AB₁, при этом в малых количествах, находящихся у предела определения методов (табл. 2). Примерно равномерное распределение между хемотипами (AB₁-/ЦПК+) и (AB₁-/ЦПК-) было свойственно не только всей изученной совокупности, но и каждой группе объектов – зерна, продуктов его переработки и зерновых смесей. У изолятов морфотипа (AB₁-/ЦПК+) содержание ЦПК варьировало от 20 до 468 нг/г, за одним исключением (1350 нг/г), при этом 80% из них образовывали ЦПК в количествах от 20 до 200 нг/г и средний по выборке уровень накопления составил 165 нг/г (табл. 2).

Не были выявлены изоляты, исключительной особенностью которых является биосинтез AB₁, а также образующие СТЕ – биосинтетический предшественник афлатоксинов, редкий среди метаболитов грибов *Aspergillus* секции *Flavi* (Frisvad et al., 2019). Полученные данные свидетельствуют о слабом токсигенном потенциале популяции *A. flavus*, представленной в отечественной зернопродукции. Редкое обнаружение продуцентов AB₁ (2%) вполне согласуется с ранее проведенной оценкой афлатоксигенности этого гриба, часто встречающегося на зерновых кормах в разных климатических зонах СССР, которую либо не находили вовсе, либо определяли с частотой не более 6.8% (Malinovskaya, Soboleva, 1980).

Изоляты из образцов зерна пшеницы и соевого шрота, проявившие способность к биосинтезу

AB₁ совместно с ЦПК, находились среди повторов (дублей), при этом совмещенные с ними культуры относились к типичным формам (табл. 3). Если бы результаты осмотра первичных посевов не были учтены, этот редкий формат токсинообразования мог остаться незамеченным. По двум изменчивым у данного вида визуальным признакам все четыре культуры не отличались – колонии имели развитый воздушный мицелий и обратную сторону без окраски.

Парные изоляты из трех других образцов – зерна ячменя (№ 454) и двух зерновых смесей (№№ 44, 107) – были одинаковы и либо соответствовали хемотипу с накоплением ЦПК на уровнях 100–400 нг/г, либо не образовывали токсины (табл. 3), при этом у них колонии были без воздушного мицелия и имели розовато-коричневую обратную сторону. Напротив, среди изолятов из зерновой смеси (№ 426) один относился к хемотипу со слабым продуцированием ЦПК (менее 100 нг/г), а второй не образовывал токсины. В этом случае и колонии резко отличались по степени развития мицелия и окраски на реверсе. Очевидно, для более полной информации по структуре популяции этого вида гриба целесообразно для каждого образца проводить внимательный осмотр первичных посевов и при выявлении каких-либо особых черт проводить подробное описание их морфологических признаков.

При определении морфотипов гриба путем культивирования изолятов на агаре Чапека с добавлением 3%-го нитрата натрия процесс образования склероциев был длительным и в отдельных случаях занимал до 21 сут, при этом склероциии,

Таблица 3. Хемотипы изолятов *Aspergillus flavus*, имеющих особенности в структуре колоний в первичных посевах (сусловый агар, 7 сут, 25°C)

Объект		№ изолята	Количество токсинов, нг/г субстрата ($M \pm SEM$)	
Наименование	№ образца		АВ ₁	ЦПК
Зерно пшеницы	428	428/1	–	–
		428/2	2 ± 1	30 ± 6
Шрот соевый	431	431/1	–	38 ± 8
		431/2	1 ± 0	25 ± 5
Зерно ячменя	454	454/1	–	398 ± 64
		454/2	–	129 ± 33
Зерносмесь	44	44/3	–	–
		44/4	–	–
	107	107/1	–	200 ± 45
		107/2	–	155 ± 49
	426	426/2	–	–
		426/4	–	60 ± 12

Примечание. АВ₁ – афлатоксин В₁; ЦПК – циклопиазоновая кислота; в скобках указано количество микотоксина (нг/г субстрата, минимальное – среднее – максимальное значение).

Таблица 4. Морфотипы изолятов *Aspergillus flavus* на двух субстратах (31°C, в темноте)

Объект	Число изолятов	Агар Чапека с 3% нитрата натрия		“5/2 agar” (аналог)	
		L	NS	L	NS
Зерно	37	14	23	26	11
Продукты переработки зерна	30	18	12	26	4
Зерновые смеси	31	21	10	26	5
Суммарно	98	53	45	78	20

как правило, были многочисленными и довольно крупными (рис. 1).

На аналоге среды “5/2 agar” процесс завершался гораздо быстрее – как правило, за 10 сут. Более того, образование склероциев было в 1.5 раза эффективнее, и склероции удалось получить у 78 культур из 98 (табл. 4). На трудности при попытках индуцировать этот процесс у *A. flavus* и на других средах – картофельно-глюкозном агаре (potato-dextrose agar, PDA), ЧДА, агаре Чапека с добавками нитрата натрия в разных количествах и сахарозы – указывали авторы нескольких работ (Cotty, 1989; Razzaghi-Abuaneh et al., 2006; Mamо

et al., 2018), но эта проблема так и остается нерешенной. По мнению авторов, среда “5/2 agar” достаточно эффективна для определения морфотипов этого гриба и может быть использована как основа для развития методологии при популяционных исследованиях.

Диаметр склероциев, образованных изолятами на обеих средах, превышал 400 мкм, следовательно, все культуры относились к L-морфотипу (табл. 4). S-морфотипы среди них отсутствовали. Факт образования крупных склероциев у 78 из 98 обследованных культур позволяет считать L-морфотип доминирующим в популяции, ассоцииро-

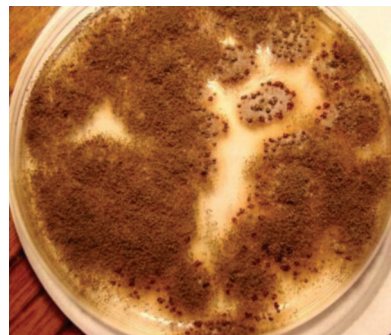
ванной с зерновой агропродукцией в Европейской России, и служит еще одним аргументом в пользу положительной корреляции этого признака со слабым токсигенным потенциалом гриба.

Согласно данным зарубежных исследователей, абиотические факторы способны активно влиять на интенсивность токсинообразования этого вида (Abdel-Hadi et al., 2012). Так, у одного из изолятов *A. flavus* с повышением влажности, температуры, продолжительности роста, а также при смене агаризованных субстратов, накопление ЦПК резко возрастало (Astoresca et al., 2014). Действительно, проблема обширной контаминации агропродукции токсичными метаболитами *A. flavus* особенно актуальна для регионов с тропическим и субтропическим климатом (Cotty, Jaime-Garcia, 2007; Giray et al., 2007; Hussaini, 2011) и признается менее значимой в Европе (Streit et al., 2012; Perrone et al., 2014). Однако в 2003 г. на севере Италии произошел неожиданный инцидент с интенсивной контаминацией зерна кукурузы АВ₁ и накоплением афлатоксина М₁ в коровьем молоке в концентрациях, превышающих норматив ЕС (Piva et al., 2006; Giorni et al., 2007). Известно, что европейская популяция *A. flavus* состоит преимущественно из L-штаммов, но смещение средних температур в сторону их повышения может способствовать распространению высокотоксигенных S-штаммов *A. flavus* и кардинально изменить ситуацию с загрязненностью агропродукции (Pietri et al., 2012).

В России АВ₁ и ЦПК крайне редко были обнаружены при регулярном мониторинге зерновой продукции из 39 субъектов 7 федеральных округов в период с 2009 по 2019 г. (Kononenko et al., 2020), но, судя по региональным данным, возможно усиление контаминации — так, в 2004–2014 гг. на юге страны аспергиллотоксины в зерне и зерносмесьях находили довольно часто и нередко с превышением ПДК (Drobin et al., 2015). В связи с этим важно продолжить исследования в тех географических районах, где климатические условия могут приводить к изменениям в токсинообразовании этого гриба, а также провести эксперименты с зерновыми культурами в условиях с контролируруемыми внешними параметрами. Подобные обследования целесообразно распространить и на популяцию *A. flavus* из травянистых луговых растений, в которых контаминация ЦПК гораздо более выражена (Burkin et al., 2018) и среди изолятов найдены высокоактивные продуценты (Burkin et al., 2006).

Повышенный интерес к штаммам *A. flavus*, лишенным способности к токсинообразованию, объясняется успешной практикой их применения для биологической коррекции ситуаций в зонах с высоким риском контаминации продукции микотоксинами (Alaniz Zanon et al., 2018). До сих пор продолжается активный поиск культур с частичной или полной утратой генов, обеспечивающих биосинтез афлатоксинов и ЦПК, в частности, с

(a)



(б)

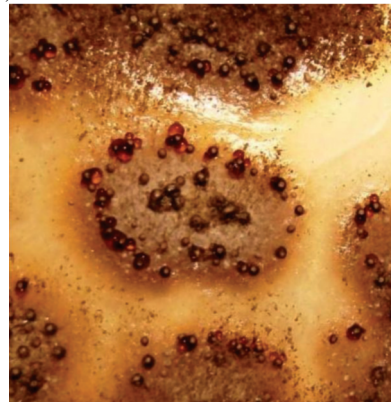


Рис. 1. Общий вид (а) и фрагмент (б) колонии изолята *Aspergillus flavus* № 87/5 из белковой добавки после 20 сут культивирования на агаре Чапека с 3% нитрата натрия при 31°C без освещения.

использованием первичных и вторичных генных маркеров (Mamo et al., 2018). Исчерпывающая оценка их безопасности и стабильности не менее важна и в биотехнологической отрасли, поскольку *A. flavus* и таксономически близкий ему вид *A. oryzae* (Ahlb.) Cohn, а также *A. niger* Tiegh., *A. foetidus* Thom et Raper, *A. fumigatus* Fresen. и *A. ochraceus* G. Wilh. давно используются для получения протеолитических ферментов (Osmolovskiy et al., 2019), а с недавнего времени — в качестве пептидно-аминокислотных ингредиентов в пищевых и кормовых добавках (Serba et al., 2020).

Таким образом, реализация комплексного подхода с описанием хемо- и фенотипических характеристик для объемной выборки изолятов гриба *A. flavus* позволила установить слабый потенциал токсигенности природной популяции и ее однородный состав, представленный исключительно L-морфотипами. Дана оценка рисков контаминации афлатоксином В₁, циклопиазоновой кислотой и стеригматоцистином зернопродукции из центральных областей Европейской части России. В ходе выполнения работы выявлены методологические приемы, требующие доработки, и обозначены перспективные направления будущего

научного поиска, имеющие фундаментальное и прикладное значение.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. (ГП 14, направление 160, номер государственной регистрации АААА-А19-119071690020-2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abdel-Hadi A., Schmidt-Heydt M., Parra R. et al.* A system approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. *J. Roy. Soc. Interface.* 2012. V. 9 (69). P. 757–767. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0482>
- Alaniz Zanon M.S., Paz Clemente M., Chulze S.N.* Characterization and competitive ability of non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolated from the maize agro-ecosystem in Argentina as potential aflatoxin biocontrol agents. *Int. J. Food Microbiol.* 2018. V. 277. P. 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.020>
- Astoreca A., Vaamonde G., Dalcero A. et al.* Abiotic factors and their interactions influence on the co-production of aflatoxin B₁ and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* isolated from corn. *Food Microbiol.* 2014. V. 38. P. 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.012>
- Burkin A.A., Kononenko G.P., Soboleva N.A. et al.* An enzyme immunoassay system for aflatoxin B₁. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2000. V. 36 (1). P. 80–84.
- Burkin A.A., Piryazeva E.A., Kononenko G.P. et al.* Cyclopiazonic acid: producers of genus *Aspergillus* Mich. ex Lk. in the composition of feed mycobiota. In: *Uspekhi meditsinskoy mikologii*, V. 7, M.: Natsionalnaya Akademiya Mikologii, 2006, pp. 94–95 (in Russ.).
- Burkin A.A., Ustyuzhanina M.I., Kononenko G.P.* Mycotoxicological monitoring: Occurrence of cyclopiazonic acid in a wide variety of feeds. *J. Vet. Sci. Technol.* 2018. V. 9. P. 90. <https://doi.org/10.4172/2157-7579-C2-040>
- Calvo A.M., Cary J.W.* Association of fungal secondary metabolism and sclerotial biology. *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 62. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00062>
- Chang P.-K., Ehrlich K.C., Fujii I.* Cyclopiazonic acid biosynthesis of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Toxins.* 2009. V. 1 (2). P. 74–99. <https://doi.org/10.3390/toxins1020074>
- Cotty P.J.* Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strain pathogenic on cotton. *Phytopathology.* 1989. V. 79. P. 808–814. <https://doi.org/10.1094/Phyto-79-808>
- Cotty P.J., Jaime-Garcia R.* Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *Int. J. Food Microbiol.* 2007. V. 119 (1–2). P. 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.060>
- Drobin Yu.D., Soldatenko N.A., Sukhikh E.A. et al.* Results of monitoring of contamination of feed grain of wheat, barley and corn in the south of Russia. *Problemy veterinarnoy sanitarii, gigieny i ekologii.* 2015. V. 4 (16). P. 27–30 (in Russ.).
- Frisvad J.C., Hubka V., Ezekiel C.N. et al.* Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Stud. Mycol.* 2019. V. 93 P. 1–63. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.001>
- Giorni P., Magan N., Pietri A. et al.* Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 2007. V. 113 (3). P. 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.007>
- Giray B., Girgin G., Engin A.B. et al.* Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. *Food Control.* 2007. V. 18 (1). P. 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.08.002>
- Hussaini A.M., Michael F.D., Patrick B.N. et al.* Natural multi-occurrence of mycotoxins in rice from Niger state, Nigeria. *Mycotoxin Res.* 2011. V. 27 (2). P. 97–104. <https://doi.org/10.1007/s12550-010-0080-5>
- Klich M.A.* *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Mol. Plant Pathol.* 2007. V. 8 (6). P. 713–722. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00436.x>
- Kononenko G.P., Burkin A.A.* Toxigenic ability of fungi from the genus *Aspergillus* and evaluation of grain and fodder contamination by cyclopiazonic acid. *Mikologiya i fitopatologiya.* 2008. V. 42 (2). P. 178–184 (in Russ.).
- Kononenko G.P., Burkin A.A., Soboleva N.A.* Specific features of albumin interactions with hemiacetals of aflatoxins and sterigmatocystin. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2003. V. 39 (1). P. 105–110.
- Kononenko G.P., Burkin A.A., Zotova E.V.* Mycotoxicological monitoring. Part 2. Wheat, barley, oat and maize grain. *Veterinary Science Today.* 2020. 2 (33): 139–145. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2020-2-33-139-145>
- Malinovskaya L.S., Soboleva N.A.* To the question of the prevalence of aflatoxigenic fungi on grain feed. In: *Vsesoyuzn. nauch.-tekhn. konf. "Problemy zashchity kormov i produktov zhivotnovodstva ot zagryazneniy toksicheskimi veshchestvami"* (Mikologiya i mikotoksikologiya): Tezisy dokladov. M., 1980, pp. 16–17 (in Russ.).
- Mamo F.T., Shang B., Selvaraj J.N., Wang Y., Liu Y.* Isolation and characterization of *Aspergillus flavus* strains in China. *J. Microbiol.* 2018. V. 56 (2). P. 119–127. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7144-1>
- Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Kurakov A.V. et al.* Micromycetes *Aspergillus flavus* and *A. oryzae* as producers of proteinases – activators of proteins of the human hemostasis system. *Mikologiya i fitopatologiya.* 2019. V. 53 (3). P. 183–185 (in Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0026364819030103>
- Ostry V., Toman J., Grosse Y. et al.* Cyclopiazonic acid: 50th anniversary of its discovery. *World Mycotoxin J.* 2018. V. 11 (1). P. 135–148. <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2243>
- Perrone G., Galio A., Logrieco A.F.* Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Europe in relation to the management of aflatoxin risk. *Front. Microbiol.* 2014. V. 5. P. 377. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00377>
- Pietri A., Battilani P., Gualla A. et al.* Mycotoxin levels in maize produced in northern Italy in 2008 as influenced

- by growing location and FAO class of hybrid. *World Mycotoxin J.* 2012. V. 5 (4). P. 409–418.
<https://doi.org/10.3920/WMJ2012.1449>
- Pildain M.B., Vaamonde G., Cabral D. Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. *Int. J. Food Microbiol.* 2004. V. 93 (18). P. 31–40.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.007>
- Piryazeva E.A., Malinovskaya L.S. The prevalence of fungi of the genus *Aspergillus* Link in feed. *Problemy veterinarnoy sanitarii, gigieny i ekologii.* 2013. № 2 (10). P. 28–31 (in Russ.).
- Piva G., Battilani P., Pietri A. Emerging issues in Southern Europe: aflatoxins in Italy. In: *D. Barug etc.* (eds). *The mycotoxin factbook, food and feed topics.* Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 2006, pp. 139–153.
- Raper K.B., Fennel D.I. The genus *Aspergillus*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1965.
- Razzaghi-Abyaneh M., Shams-Ghahfarokhi M., Allameh A. et al. A survey on distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in corn field soils in Iran: Population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. *Mycopathologia.* 2006. V. 161 (3). P. 183–192.
<https://doi.org/10.1007/s11046-005-0242-8>
- Serba E.M., Tadzhibov P.Yu., Rimareva L.V. et al. Obtaining peptide-amino acid ingredients based on *Aspergillus oryzae* fungal biomass. *Mikologiya i fitopatologiya.* 2020. V. 54 (1). P. 23–32 (in Russ.).
<https://doi.org/10.31857/S0026364820010079>
- Streit E., Schatzmayr G., Tassis P. et al. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed – Focus on Europe. *Toxins.* 2012. V. 4 (10). P. 788–809.
<https://doi.org/10.3390/toxins4100788>
- Vaamonde G., Patriarca A., Fernández Pinto V. et al. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 2003. V. 88 (1). P. 79–84.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00101-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00101-6)
- Wang Z-G., Tong Z., Chen S.-Y. et al. Study on pectinase and sclerotium producing ability of two kinds of *Aspergillus flavus* isolates from Zhejiang. *Mycopathologia.* 1993. V. 121 (3). P. 163–168.
<https://doi.org/10.1007/bf01104072>
- Буркин А.А., Пирязева Е.А., Кононенко Г.П. и др. (Burkin et al.) Циклопиазоновая кислота: продуценты из рода *Aspergillus* Mich. ex Lk. в составе микобиоты кормов // Успехи медицинской микологии. Т. 7. М.: Национальная Академия Микологии, 2006. С. 94–95.
- Дробин Ю.Д., Солдатенко Н.А., Сухих Е.А. и др. (Drobin et al.) Итоги мониторинга контаминации фуражно-го зерна пшеницы, ячменя и кукурузы на юге России // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2015. № 4 (16). С. 27–30.
- Кононенко Г.П., Буркин А.А. (Kononenko, Burkin) Токсикообразующая способность грибов рода *Aspergillus* и оценка загрязненности циклопиазоновой кислотой кормовой продукции // Микология и фитопатология. 2008. Т. 42. № 2. С. 178–184.
- Малиновская Л.С., Соболева Н.А. (Malinovskaya, Soboleva) К вопросу о распространенности афлатоксигенных грибов на зерновых кормах // Тез. докл. Всесоюз. науч.-техн. конф. “Проблемы защиты кормов и продуктов животноводства от загрязнений токсическими веществами” (Микология и микотоксикология). Москва, 1980. С. 16–17.
- Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Кураков А.В. и др. (Osmolovskiy et al.) Микромитеты *Aspergillus flavus* и *A. oryzae* как продуценты протеиназ – активаторов белков системы гемостаза человека // Микология и фитопатология. 2019. Т. 53. № 3. С. 183–185.
- Пирязева Е.А., Малиновская Л.С. (Piryazeva, Malinovskaya) Распространенность грибов рода *Aspergillus* Link в кормах // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2013. № 2 (10). С. 28–31.
- Серба Е.М., Таджибов П.Ю., Румарева Л.В. и др. (Serba et al.) Получение пептидно-аминокислотных ингредиентов на основе грибной биомассы *Aspergillus oryzae* // Микология и фитопатология. 2020. Т. 54. № 1. С. 23–32.

Chemo- and Phenotypes of the Potentially Toxicogenic Fungus *Aspergillus flavus*

G. P. Kononenko^{a,#}, E. A. Piryazeva^{a,##}, E. V. Zotova^{a,###}, and A. A. Burkin^{a,####}

^aAll-Russia Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene, and Ecology, Skryabin and Kovalenko Federal Scientific Center
 All-Russia Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Moscow, Russia

[#]e-mail: kononenkogp@mail.ru

^{##}e-mail: piryazeva01@yandex.ru

^{###}e-mail: ezotova63@gmail.com

^{####}e-mail: aaburkin@mail.ru

In recent years, when studying the biochemical and physiological characteristics of the *Aspergillus flavus*, special attention has been paid to the heterogeneity of its toxigenic potential and morphological features. For populations associated with agricultural products in many regions of the world, differences in the ratio of chemotypes are described and signs of correlation between the degree of aflatoxigenicity and the size of sclerotia are revealed. In this work, for the first time, a comparative assessment of the toxin formation and phenotypic composition of *A. flavus* from the composition of the mycobiota of Russian grain, its processed products and grain mixtures was performed. Determination of aflatoxin B₁ (AB₁), sterigmatocystin (STE), cyclopiazonic acid (CPA) in biomass

samples obtained after 7 days. Cultivation of isolates on wort agar at 25°C was carried out by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay. In the sample of 98 cultures, mainly nontoxigenic forms (46 isolates) and CPA producers (50 isolates) were represented, in which the accumulation of the toxin averaged 165 ng/g of substrate, ranged from 20 to 468 and in only one case was equal to 1350 ng/g. AB₁ (1 and 2 ng/g) and CPA (25 and 30 ng/g) were detected in small amounts in two isolates together. Producers of STE, as well as isolates capable of forming exclusively AB₁, were not found. The process of sclerotia formation on a substrate with vegetable juices (an analogue of agar “5/2”) was observed more often and completed in 10 days, while on Czapek agar with the addition of 3% sodium nitrate in some cases could take up to 20 days. It was shown that all 78 cultures of *A. flavus* belonged to the L-type with large sclerotia (with a diameter of more than 400 microns). The weak potential of toxin formation of the population corresponded to a homogeneous phenotypic composition.

Keywords: aflatoxin B₁, *Aspergillus flavus*, cyclopiazonic acid, ELISA, sclerotial size, sterigmatocystin