DOI: 10.17117/nm.2015.01.045

<http://ucom.ru/doc/nm.2015.01.045.pdf>

Поступила (Received): 10.08.2015

Беляева Л.Л., Танасева С.А. Условия роста мицелиальных грибов и биосинтез микотоксинов

Belyaeva L.L., Tanaseva S.A.
Terms of growth of filamentous fungi and
mycotoxin biosynthesis

Описан механизм биосинтеза и способы получения препаратов наиболее опасных для человека и животных микотоксинов: патулина, охратоксина и афлатоксина, энниатинов, Т-2 токсина, ДАС, зеараленона и макроциклических трихотеценовых микотоксинов

Ключевые слова: микотоксины, биосинтез, культивирование, получение стандартов препаратов

The mechanism of biosynthesis and methods of making drugs more dangerous for humans and animals mycotoxins: patulin, ochratoxin and aflatoxin, enniatinov, T-2 toxin, DAS, zearalenone and macrocyclic trichothecene mycotoxins

Key words: mycotoxins, biosynthesis, cultivation, receiving standard medications

Беляева Лариса Лазаревна

к.б.н., в.н.с. научно-исследовательского центра
Федеральный центр токсикологической,
радиационной и биологической безопасности
г. Казань, Научный городок-2

Belyaeva Larisa Lazarevna

c.b.s, leading researcher Research Center
Federal Centre for Toxicological, Radiation and
Biological Safety
Kazan, Nauchnyy gorodok-2

Танасева Светлана Анатольевна

к.б.н., с.н.с. лаборатории микотоксинов
Федеральный центр токсикологической,
радиационной и биологической безопасности
г. Казань, Научный городок-2

Tanaseva Svetlana Anatoljevna

c.b.s Laboratory mycotoxins
Federal Centre for Toxicological, Radiation and
Biological Safety
Kazan, Nauchnyy gorodok-2

Для мониторинга микотоксинов в различных продуктах и кормах и изучения механизма действия, необходимо наличие стандартных хорошо очищенных их препаратов. Поэтому исследование путей синтеза и превращения микотоксинов является актуальной проблемой. Знание этих процессов поможет влиять на изобретение более эффективных способов получения препаратов токсинов. В предлагаемом обзоре обобщены результаты исследований в этом направлении для различных видов плесневых грибов по отбору активных штаммов-продуцентов, разработке оптимальных условий их культивирования и способов очистки полученных токсинов с дальнейшей их идентификацией и количественным определением.

Механизмы образования микотоксинов из первичных метаболитов зависят от вида продуцента и условий биосинтеза. Среди них выделяют: 1) поликетидный, ха-

ракторный для афлатоксинов, охратоксинов, патулина и др.; 2) терпеноидный, соответствующий трихотоценовым микотоксинам; 3) опосредованный через цикл трикарбоновых кислот (для рубратоксинов); 4) аминокислотный (когда исходными соединениями являются аминокислоты) – при образовании эргоалкалоидов, циклопиазоновой кислоты и др.; 5) смешанный (сочетание двух и более механизмов), присущий для производства циклопиазоновой кислоты. Основным для биосинтеза большой группы микотоксинов является поликетидный механизм (1).

У плесневых грибов *Penicillium citrinum* наиболее интенсивное накопление микотоксина цитринина обнаруживали в результате их роста в рисе - (300-350 мг/кг зерна) при культивировании в течение 21 суток. Для исследования были использованы штаммы микроскопических грибов вида *P. citrinum* F-253, F-254, F-1069, F-1079, F-2358, F-3013, F-3057 из Всероссийской коллекции микроорганизмов института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН. Исследовали морфологические и культуральные свойства перечисленных штаммов, оценивали скорость роста и формирование колоний, форму колоний, пигментинизирование на среде Сабуро, агаре Чапека, модифицированной среде Чапека-Докса, картофельно-глюкозном агаре в течение 5-7 суток при температуре 25⁰ С. При микроскопическом изучении культур определяли состояние мицелия, наличие конидиеносцев и форму конидий.

Обнаруженные характерные культуральные свойства тест-культур и данные микроскопии подтвердили принадлежность исследованных штаммов (у 3-х из 7-и) исследованных культур (F-1079, F-3013, F-3057), у которых была выявлена способность к образованию ярко-желтого или лимонно-желтого пигмента, интенсивно диффундирующего в агар; что является характерным признаком для вида *P. Citrinum*. Подобранные штаммы высевали на твердые растительные субстраты: пшеницу, рожь, ячмень и рис, стерилизованные при 121⁰С в течение 45 мин, с конечной влажностью 30±1%. Для инокуляции использовали 5-суточные культуры микроскопических грибов, выращенные на скошенной среде Сабуро или модифицированной среде Чапека-Докса. Суспензии с концентрацией клеток 10⁷/см³ соответствующего штамма вносили асептически в колбы со стерильным зерном. Подсчет количества спор грибов проводили в камере Горяева, а контроль концентрации тест штаммов по способности спор прорасти на среде Сабуро при термостатировании в течении 5 суток при температуре 25⁰С.

Длительность культивирования проб контаминированного зерна составляла 15 суток при температуре 24±1⁰С. Образцы зерна после инкубирования инаktivировали и проводили экстракцию цитринина 70%-ным раствором метанола. Количественный уровень цитринина в экстрактах определяли методом твердофазного гетерогенного ИФА с использованием тест-системы «RIDAS-CREEN Citrinin» (2).

Микотоксин патулин вырабатывается микроскопическими грибами рода *Penicillium*: *P. Urticae*, *P. griseofulvum*, *P. Expansum*, *P. Claviforme*. Установлен факт значительной способности продуцировать микотоксин патулин видом гриба *P. urticae*. Патулин преимущественно и в значительных количествах обнаруживают в томатах, яблоках, свекле и других овощах и фруктах, а также в силосе, сене, в зерновых: кукурузе, пшенице. Он стабилен в яблочном соке и сухом зерне и нестабилен в сыром зерне и в присутствии SO₂ и воды. Патулин хорошо растворим в воде и органических растворителях, кроме петролейного эфира, имеет один пик поглощения в УФ-свете при 276 нм, точка плавления 111⁰С.

Образование патулина, как и всех других микотоксинов, зависит от штаммовой специфичности, субстрата и температуры. Так *P. expansum* шт. 550 образовывал 40 мкг/кг патулина через 12 дней инкубации при 4⁰С на минерально-солевой среде с сахарозой. При 25⁰С тот же штамм образовывал патулин в количестве только 3 мг/мл. Максимальное образование микотоксина (70 мг/мкг) при культивировании гриба *P. urticae* шт. 512 на томатной культуре при рН 3,7 происходило при 10⁰С. При 0⁰С и 25⁰С образование токсина было ничтожно малым (3).

Имеются разнообразные и противоречивые сообщения по поводу выращивания продуцентов патулина на различных искусственных питательных средах, содержащих глюкозу, азотнокислый и фосфорнокислый натрий, сернокислое железо и магний, хлористый калий, приготовленных на дистиллированной воде. Наши эксперименты не подтвердили возможность получения патулина таким образом из-за незначительного выхода и нестабильности препарата токсина в процессе хранения.

В своей работе мы использовали природные субстраты: пюре тыквы, смородины, томатов и яблок, засеянные музейным штаммом гриба *P. urticae* шт. 512. Активный рост культуры наблюдали через 16-18 дней при температуре 19-23⁰С. Экстрагировали патулин этилацетатом и высушивали силикагелем 100/400-α' (Чехословакия). Силикагель вносили в колонку Н=30 см, Д=2 см. Токсин элюировали диэтиловым эфиром или смесью бензол-этилацетат со скоростью протекания 80 капель/сек. Очищенные фракции (по 20 мл) собирали и регистрировали выход патулина по образованию белых кристаллов, которые отмывали охлажденным диэтиловым эфиром и выдерживали 2-е суток над безводным хлористым кальцием. Количество патулина определяли методом ТСХ с последующим его подтверждением методом масс-спектрометрии по появлению пика при m/z=154, что указывало на молекулярную массу патулина и определением точки плавления. Максимальный выход токсина 120 мг/кг наблюдался при культивировании спор гриба на яблочном пюре (4).

Известно, что биосинтез вторичных метаболитов у микроорганизмов значительно возрастает при воздействии на них стресс-факторов. Основной ответной реакцией на действие стрессоров является торможение метаболической активности, соответствующей вегетативной жизни и появлению новых биохимических механизмов, отвечающих стрессовому состоянию организм (5). Наши исследования показали, что прогревание яблочного субстрата, засеянного спорами гриба *P. urticae* в течение часа через 15 дней культивирования до 70⁰С – содержание патулина в нем возрастало в 3-5 раз. Препарат был стабильным в течение года при хранении его в холодильнике при +4⁰С (4).

Патулин также был получен с использованием штамма *P. expansum*, выделенного из гниющих яблок, которые хранили при 0⁰С. Стерилизованным стеклянным прутом делали проколы в плодах, в которые шпателем вносили мицелий гриба, выращенный на картофельнодекстрозном агаре. Затем эти яблоки хранили в перфорированных полиэтиленовых пакетах при 25⁰С. Распавшуюся в результате гниения ткань яблок (навески в количестве 100 г), перемешивали трижды в течение трех минут с этилацетатом (порции 50 мл) и фильтровали через бумажный фильтр. Полученный экстракт (150 мл) испаряли досуха и растворяли в 5 мл этилацетата, который исследовали на содержание патулина на кварцевых пластинках Mallinckrodt в системе ме-

танол: бензол: уксусная кислота (90:5:5). Патулин на пластинке проявлялся в ультрафиолете ($R_f=0,47$) в виде темного пятна на уровне двух стандартных. Предел обнаружения микотоксина составлял до 45 мг/л (6).

Для исследования синтеза патулина и механизма его взаимодействия с аминокислотами использовали яблочные соки и вина. По одним литературным данным микотоксины патулин и афлатоксин синтезируются из довольно ограниченного числа продуктов основного метаболизма, таких, как ацетат, мевалонат, различными путями: конденсации, окисления, восстановления, алкилирования, и циклизации. Из других источников известно о существовании нескольких путей биосинтеза этих микотоксинов. С использованием ядерно-магнитного резонанса было доказано, что биосинтез микотоксинов может осуществляться также из простых по химическому строению промежуточных продуктов основного метаболизма, а именно из органических кислот и аминокислот и тоже в результате реакций конденсации, окисления, восстановления, алкилирования и циклизации.

Множество литературных ссылок, свидетельствует, что биосинтез таких микотоксинов, как патулин, афлатоксины и ократоксины осуществляется поликетидным методом, который является главным для биосинтеза самой большой группы микотоксинов. В его основе лежит линейная конденсация кофермента ацетил- C_0A с тремя и более молекулами кофермента малонил- C_0A с одновременным декарбоксилированием, но без обязательного восстановления промежуточных β -карбонильных соединений.

Относительно патулина четкие данные о пути и механизме его образования отсутствуют. Реакционная способность патулина была проанализирована исходя из его структуры и наблюдений о снижении концентрации аминокислот при его образовании (треонина, аланина и серина). Исследования показали, что присутствие патулина существенно изменяет концентрацию таких важных компонентов вин, как аминокислоты, что снижает их биологическую ценность (7).

Биосинтез микотоксинов циклогексадепептидов (энниатинов), продуцируемых грибами рода *Fusarium* исследовали при культивировании изолятов на зерновом субстрате или при глубинном культивировании. Литературные данные о влиянии на этот процесс различных источников углерода и азота свидетельствуют, что, наиболее приемлемой для микробиологического синтеза энниатина В при глубинном культивировании являлась модифицированная среда Рихарда следующего состава (%): глюкоза -5,0; NH_4NO_3 - 1,0; KH_2PO_4 - 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,25; $FeCl_3$ - 0,002. Вещества извлекали из 3-4-х суточного мицелия. При этом отмечалось, что при более длительной ферментации количество энниатинов в мицелии уменьшалось, а в культуральной жидкости совсем не определялось.

Энниатины находили как в культуральном фильтрате, так и в мицелии *F. acuminatum*, *F. compactum* (Wollenw.) W.L. Gordon, выращиваемом в течение 7-ми суток на среде следующего состава (г/л): мальтоза - 50, пептон - 6, дрожжевой экстракт - 5, KH_2PO_4 - 0,75, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5, $CaCl_2 \cdot H_2O$ - 0,007.

В других исследованиях выращивание *F. lateritium* Neesvar. *stilboides* (Wollenw.) Bilai проводили в ферментерах на среде следующего состава: 9 (г/л): глюкоза - 40,0, глицерин - 40,0, соевая мука - 5,0, KNO_3 - 8,0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5. Максимальное накопление энниатина В в культуральной жидкости происходило на 8-9

сутки и сохранялось без значительных изменений до 10-11-х суток. В условиях глубинного культивирования *F. scirpi* продуцирует энниатины в процессе мицелиального роста. Биосинтез прекращается в стационарной фазе. Однако при добавлении L-валина в среду при переходе от ростовой к стационарной фазе биосинтез может продолжаться и количество образующегося энниатина В увеличивается. Энниатин В был обнаружен и в спорах грибов в количестве 2 мг/г сухого веса спор.

В отличие от многих энзимов вторичного метаболизма, которые репрессированы в период роста и индуцируются в конце тропофазы, биосинтез энниатинсинтетазы непрерывно поддерживается в процессе мицелиального роста и в стационарной фазе. Энниатинсинтетазы, выделенные из *F. sambucinum* и *F. lateritium*, проявляли разную субстратную аминокислотную специфичность и охарактеризованы как изо-мультиэнзимы. Так, энзим, выделенный из *F. sambucinum* – продуцента энниатина А, имел высокую аффинность с их субстратными аминокислотами L-лейцином L-изолейцином, а синтетаза из *F. lateritium* – продуцента энниатина В предпочитала L-валин.

Выделенные энниатинсинтетазы открывают возможность получения энниатинов *in vitro*, что позволяет получать более широкий их ассортимент, в том числе таких необычных природных веществ, когда в качестве аминокислотных фрагментов выступают аланин, цистеин, треонин и серин, а 2-оксиизовалериановая кислота могла быть заменена 2-оксимасляной или молочной кислотами. Ряд новых аналогов был получен путем добавления разных предшественников в питательную среду при культивировании *in vivo* *F. scirpi* и *F. sambucinum*, продуцирующих энниатины.

Биосинтез боверицина осуществляется аналогично, при посредстве мультифункционального энзима, который может быть выделен (например, из *Beauveria bassiana*) и использован для биосинтеза *in vitro* в присутствии составляющих аминокислот, S-аденозилметионина, АТФ и Mg^{2+} (8).

Оптимальными условиями культивирования для роста и образования афлатоксина В₂ патогенным для человека штаммом гриба *Aspergillus flavus* является: выращивание гриба на синтетической агаровой среде в течение 2-х недель до образования споруляции. Для этого готовили суспензию спор на стерильной воде и 1 мл (3×10^6 мл) использовали для засева в конические колбы на 500 мл, содержащих синтетическую агаровую среду. Культуру инкубировали в течение 8 дней при 30°C. После икубации мицелий отделяли от культуральной среды вакуумной фильтрацией, сушили в течение ночи при 80°C и взвешивали. Афлатоксин из культуральных субстратов экстрагировали хлороформом и очищали методом ТСХ на адсорбенте 1 в элюирующей смеси хлороформ-ацетон-вода (88:12:1,5) об/об с известными стандартами. Флуоресцирующие в ультрафиолете соединения с R_f на уровне стандартных пятен элюировали метанолом и определяли концентрацию молярной экстинкции. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре.

Этот микроскопический гриб давал максимальные количества токсина после 8-ми дней инкубации в стационарной культуре при 30°C в темноте. Повышение количества афлатоксина наблюдалось в основной среде с сульфатом аммония в качестве источника азота, при оптимуме рН среды 4,5, и когда источником углерода была не мальтоза или глюкоза, а сахароза. Оптимальная температура роста 37°C. Если сапрофиты, как свидетельствуют литературные данные, дают оптимальный рост при 20-32°C, патогенные для человека штаммы лучше растут при повышенной температуре.

На процесс токсинообразования исследовали также влияние источников углерода и азота: для чего сахарозу-аммоний сульфат в основной среде заменяли различными источниками углерода и азота при эквивалентных концентрациях на процентной основе (вес/объем). Засеянные колбы инкубировали в темноте в виде стандартных культур при 30⁰С. Через 8-м дней роста в культуральных средах определяли сухой вес и содержание микотоксина. В качестве источника углерода изучали 6 типов углеводов и все они поддерживали активный рост мицелия. Однако в присутствии фруктозы, крахмала и раффинозы рост не сопровождался соответственным повышением уровня выхода токсина. Наибольшее количество афлатоксина продуцировалось на средах, содержащих сахарозу, мальтозу или глюкозу в нисходящем порядке эффективности. Среди изученных источников азота наилучший результат был получен при использовании аспарагина и сульфата аммония. При условиях культивирования на свету заметно подавлялось токсинообразование, независимо от температуры инкубации.

Наибольшее количество токсина 117 мкг/100 мл среды было получено на 8-ой день культивирования, хотя рост мицелия возрастал до 16-го дня, при рН среды 4,5 и температуре 37⁰С. Питательная среда с добавлением сульфата аммония в качестве источника азота при рН 4,5 и сахарозы способствовали активации синтеза токсина (9).

Для оценки токсинообразования грибов *Fusarium roae* стерильный зерновой субстрат (рис) с влажностью 30% засеивали инокулюмом (взвесь клеток гриба в 0,01% водном растворе твина-80, около 20 тысяч диаспор/мл. выращивали в течение 2-х недель в двух режимах: только при 25⁰С и при 25⁰С в первой и при 8⁰С – во второй половине сроков инкубации, а также в варианте 16 недель при 8⁰С. По завершении экспериментов образцы мицелиально-зерновой биомассы гомогенизировали в ацетонитриле и полученные экстракты анализировали методом непрямого конкурентного ИФА (10).

Для исследования физико-химических и токсических свойства гриба *Fusarium Sporotrichiella* изучаемые штаммы выращивали на стерильной смеси овса и проса в течение 4-5 суток при +28⁰С и затем 4 недели при +8⁰С. Микотоксины выделяли из высушенного и измельченного субстрата экстрагированием смесью ацетона и хлороформа 1:1. Экстракты упаривали в вакууме до полного удаления растворителя, маслообразный остаток темно-бурого цвета частично очищали от примесей путем смешивания с 20-кратным объемом метанола нагретого до 50-55⁰С, и отделением фильтрованием выпавшего осадка. Идентифицировали полученные очищенные экстракты хроматомасс-спектрометрией с предварительной их очисткой на колонке с силикагелем ЛС 5/40 мкм, содержащим 13% гипса (11).

Получение препаратов Т-2 токсина и зеараленона осуществляли с использованием штамма *F.sporotrichioides* 5328ф, выделенного Квашиной Е.С. в 1954 г. из нескошенного овса в Московской области, а также мутанта 2m, полученного одним из авторов в 1967 г. в результате обработки N-нитрозометилмочевинной конидий штамма 5328а. Мутант 2m в 4-5 раз превосходил по микотоксинсинтезирующей активности исходный штамм 5328а и это качество сохранялось в течение 19 лет. Способность его синтезировать Т-2 токсин на рисе в несколько раз превосходила штамм 5328а и составляла 1330-1600 и 180-310 мг/кг. В лиофильно высушенном состоянии продуценты Т-2 токсина и зеараленона сохранили свою активность в течение 14 лет. Оба

штамма поддерживали на картофельном агаре, пересевы осуществляли 1 раз в 6 месяцев и хранили при 4-10°C.

В последующем, используя методы селекции и мутагенеза, от 2m было получено 4 группы мутантных штаммов, различающихся по способности вырабатывать Т-2 токсин и зеараленон: наиболее активные штаммы продуцировали Т-2 токсин в количествах 12 000 мг/кг, зеараленон – до 40 000 -50 000 мг /кг и ауурофузарин – до 8 000 мг/кг. У некоторых мутантов было выявлено существенно новое качество, не характерное как для 5328a и 2m так и в целом для *F. sporotrichioides* - вырабатывать Т-2 токсин при 24-28°C, к тому же в больших количествах. Все мутанты обладали соматической нестабильностью. Образующиеся сегреганты были менее способны к токсинообразованию, но, как правило, имели явное селективное преимущество в сравнении с исходным типом (12).

Согласно разработанной методике ВНИИС получение кристаллического препарата стандарта Т-2 токсина осуществляли следующим способом. В стерильные колбы с рисом (200г) вносили культуру гриба, выращенную на агаре. Мицелий выращивали в течение 2-х недель при температуре 25-30°C, затем колбы помещали на три недели в холодильник. Токсин экстрагировали ацетоном. Объединенные экстракты фильтровали и выпаривали на ротационном испарителе (РИ), а оставшийся водный экстракт переэкстрагировали смесью гексан-эфир (1:1) с добавлением 4%-ного раствора NaCl в количестве 100 мл. Затем содержимое интенсивно перемешивали и отстаивали до разделения на два слоя. Эту процедуру повторяли 3 раза, каждый раз отбирая на делительной воронке верхний гексан-эфирный слой, который очищали безводным сульфатом натрия. Объединенные и отфильтрованные гексан эфирные фракции выпаривали на РИ до 100 мл, куда добавляли силикагель (АСК).

После тщательного перемешивания силикагеля с экстрактом, его помещали в колонку с активированным силикагелем, (прокаленным при температуре 130-160°C в течение 6 часов). Объем сухого силикагеля должен быть в 3-4 раза больше объема силикагеля с экстрактом. Для удаления неполярных липидов через колонку вначале пропускают гексан (1 литр), который отбрасывают. Токсин из колонки элюировали смесью гексана с хлороформом в соотношении 1:1 в количестве 1-15 л. Элюат возгоняли на ротационном испарителе до 100 мл, и смешивали с силикагелем для колоночной хроматографии (100-400) зернения и высушивали на воздухе до полного высыхания. Затем колонку для хроматографии заполняли чистым силикагелем, а сверху силикагелем с гексан-хлороформенным экстрактом. После чего добавляли смесь растворителей гексан-эфир и безводный сернокислый натрий. Элюировали токсин смесью гексан-эфир в количестве примерно 1-1,5 л.

Первую партию растворителя после протекания из колонки (200 мл) отбрасывали поскольку она не содержит микотоксин. Остальные партии по 100 мл каждая высушивали под вытяжным шкафом до образования кристаллов, в случае их отсутствия все порции, содержащие токсин объединяли и выпаривали на (РИ), а остаток помещали в колонку меньшего размера или бюретку и всю процедуру повторяли снова. Если при кристаллизации гексан полностью не удаляется, то содержимое пропускают через бумажный фильтр и после подсыхания с него соскабливают кристаллы (13)

Метаболический профиль грибов рода *Fusarium* MLK как потенциальных продуцентов биосинтеза Т-2 токсина и диацетоксисцирпенола (ДАС) исследовали на изолятах *f.acuminatum*, *f.avenacium*, *f.graminearum*, *f.moniliforme*, *f.proae*, *f.sambucinum*, *f.semitectum*, *f.sporotrichioides*, *f.equiseti* и *f.tricinctum* из состава микобиоты зерна, возделанного на территории Российской Федерации. Видовая идентификация изолятов была проведена в соответствии с таксономической системой С. Booth (1971). Измерения концентрации токсинов в экстрактах мицелиальной биомассы, полученной культивированием фузариев на сусловом агаре в течение 7-10 суток, проводили методом непрямого конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа.

Как показали исследования образование ДАС является характерным свойством видов *f.proae*, *f.sporotrichioides* и *f.equiseti*, у которых на долю продуцентов приходится 85,5% (65 из 76 изолятов), 75,5% (34/45) и 63,2% (24/38) соответственно. Вид *f.proae* среди них занимает особое положение: большинство продуцирующих изолятов – 76,9% способны к накоплению ДАС в количествах более 100 нг/мл. У двух других видов преобладали продуценты с уровнем накопления токсина от 4 до 100 нг/мл.

По интенсивности биосинтеза Т-2 токсина *f.sporotrichioides* превосходил остальные виды, все изоляты без исключения были продуцентами и большинство из них накапливали токсин в количествах более 1000 нг/мл. У *f.proae* доля продуцентов составляла 7,9% (6/76), уровня токсина в экстрактах – от 4 до 100 нг/мл. Виды *f.tricinctum* и *f.semitectum* имели слабо выраженную способность к образованию ДАС как по уровням накопления (4-20 нг/мл), так и по числу продуцентов в выборках - 8 из 23 и 4 из 20 соответственно. Виды *f.avenacium* (49 изолятов), *f.graminearum* (28) изолятов и *f.acuminatum* (23) изолята не обладали этой способностью. В выборке из 13 изолятов *f.moniliforme*, сформированной без уточнения подвидов, и среди 4 изолятов *f.sambucinum* продуценты также не были выявлены (14).

Относительно немногочисленны и зачастую противоречивые сведения о физиологии токсинообразования и токсигенного потенциала МЦТЦ. Более изученные в этом плане грибы, образующие простые трихотецены (5). Так *D.toxicum* образует токсические вещества как при инфицировании природных субстратов, так и при культивировании в лабораторных условиях на синтетических средах. Микотоксины образуются в мицелии и культуральной жидкости при поверхностном и глубинном способах культивирования гриба. Наиболее активный синтез токсических метаболитов имеет место на средах с сахарозой, крахмалом, мальтозой, глюкозой, фруктозой, глицерином, а хороший рост гриба на отдельных углеродных субстратах не всегда коррелирует с его токсинообразованием. Однако, высокая антибиотическая активность выделенных препаратов в отношении дрожжевой тест-культуры, а также их высокая токсичность для лабораторных животных отмечалась только при культивировании гриба на средах с глюкозой.

Высокая активность токсинообразования наблюдалась при использовании в качестве источников азота аммония азотнокислого и фосфорнокислого, а ее ингибирование, наряду с ингибированием роста, отмечалось на средах с хлористым, углекислым и щавелевокислым аммонием. При использовании аминокислот в качестве единственного источника азотного питания было установлено активирование роста гриба в присутствии глутаминовой кислоты, β -аланина, β -фенил-аланина, а его токсинообразующая способность усиливалась при добавлении в среду β -аланина, глутаминовой

кислоты, лейцина, лизина, орнитина. При изучении физиологии биосинтеза (макроциклических трихотеценовых микотоксинов (МЦТЦ) у *D. Toxicum* наблюдалось значительное увеличение синтеза веррукаринов и роридинов при добавлении в среду ионов цинка или марганца в тех же концентрациях. Микотоксин стимулирующее действие было отмечено также при внесении ионов бора и кальция, в то время как ионы молибдена, кобальта и меди проявляли ингибирующее действие.

Максимальный синтез токсинов у видов *Stachybotrys* отмечался на средах, в которых в качестве источника углерода использовали арабинозу, галактозу, крахмал, глюкозу, сахарозу, а в качестве источника азота — глицин, аланин, триптофан, лейцин, аспарагин. Введение в среду повышенных концентраций глюкозы, а также витаминов B₁, C и особенно никотиновой кислоты, способствовало существенному усилению роста и токсинообразования.

S. Alternans. штаммы которого, выделенные из природных целлюлозосодержащих субстратов, проявляли хороший рост на соломе различных злаковых культур, стеблях льна, конопли, джута, коробочках хлопчатника, а также с успехом культивировались на овсе и соломе.

Исследования физиологии токсинообразования видов *Myrothecium* свидетельствуют о преимущественном использовании среды Чапека-Докса в различных модификациях, состоящих главным образом во введении сложных растительных и животных вытяжек типа пептона, дрожжевого и солодового экстракта. В отдельных случаях использовали синтетические среды. В качестве основного источника углерода, как правило, используется глюкоза, а в качестве источников азотного питания — азотно-кислый натрий, азотнокислый аммоний, хлористый аммоний, концентрации которых в среде варьировали в довольно широких пределах. Некоторые исследователи вводили в состав среды ионы цинка и железа.

Большинство штаммов грибов, образующих МЦТЦ, выращивают в течение 2-5, иногда — 7-10 суток в условиях глубинного культивирования. В условиях стационарного культивирования на жидких средах или при культивировании на твердых природных субстратах эти сроки, как правило, удлиняются до 10-60 сут и могут существенно варьировать в зависимости от конкретных штаммов и других условий культивирования. Штаммы грибов, образующих МЦТЦ, хорошо растут в широком диапазоне температур, однако, максимум как роста, так и токсинообразования характерен для температур порядка 25-27⁰С. Так, температурный оптимум роста *S.alternans* составлял 20-25⁰С, в то время как температурные границы роста лежали в пределах 2-39⁰С. Большинство штаммов *Myrothecium* лучший рост и токсинообразование проявляли при температуре 27⁰С, хотя некоторые исследователи с успехом культивировали их при температуре 20⁰С. Оптимальная температура для роста штаммов *Dendrodochium* около 25⁰С, хотя довольно интенсивный рост отмечается при 7-35⁰С. Очень мало сведений по-поводу влияния pH среды на токсинообразование штаммов, образующих МЦТЦ. Так было показано, что *M.Verrucaria* ВКМ-183, характеризующийся высокой фитотоксической активностью, проявлял хороший рост в границах pH от 3,0 до 7,0 с оптимумом при pH 4,5-5,5, в то время как максимальная фитотоксическая активность отмечалась при pH 4,5-5,0. Хороший рост и токсинообразование *D. Toxicum* наблюдается при pH 5,2-5,8, однако к концу 4-х суток глубинного культивирования уровень pH повышался до 6,8-7,3 (17). Был также изучен токсигенный потенциал МЦТЦ. Несмотря на повсеместное распространение грибов, образующих

МЦТЦ сведения относительно их токсигенного потенциала весьма ограничены, поскольку такие исследования большей частью проводили на единичных штаммах.

Для исследования токсигенного потенциала 68 штаммов грибов, культивируемых на просе использовали культуры грибов, выделенных из почвы, ризосферы сельскохозяйственных растений, различных растительных субстратов, а также ряд коллекционных штаммов. Исследуемые культуры распределяли по видам следующим образом: *D. Toxicum* (39шт.), *M. Verrucaria* (10шт.), *M. Roridum* (6шт.), *M. cinctum* (4шт.), *S. alternans* (4шт.), *S. Atra* (5шт.). Наряду с изучением компонентного состава МЦТЦ при помощи ВЭЖХ, исследовали также ряд других свойств: токсичность (кожная проба), антибиотическую активность в отношении дрожжевой тест-культуры, морфологокультуральные особенности грибов и т. п.

Способность синтезировать МЦТЦ является для изученных видов грибов общим свойством, которое определяет их высокий токсигенный потенциал; уровень образования МЦТЦ варьирует в значительной степени как среди изученных видов, так и штаммов одного вида. Более высок он у штаммов *D. toxicum*, *M. verrucaria*, *M. roridum*. Среди этих видов отмечается значительно больший процент высокотоксичных штаммов. Установлена коррелятивная зависимость между активностью спороношения исследуемых штаммов и их токсинообразованием. Более выражена эта зависимость у изученных представителей *D.toxicum* и *M.verrucaria*; для изученных штаммов *M. Cinctum* впервые установлена способность синтезировать МЦТЦ. Однако, уровень образования этих метаболитов значительно ниже, чем у представителей *D. Toxicum* и *M. Verrucaria*. Была впервые установлена способность отдельных штаммов *Stachybotrys* к образованию, наряду с другими метаболитами: верукарин А, роридина А и роридина Н, которые синтезируются в незначительных количествах; в зависимости от вида образование других, не идентифицированных компонентов МЦТЦ (от 2 до 5). Связь физиологической активности трихотеценовых микотоксинов с наличием в их структуре 12,13-эпоксигруппы, а также олефиновой связи в положении "9,10" предполагает сходный спектр биологических эффектов этих веществ (15).

Коллекционные штаммы продуцентов охратоксина представлены двумя видами (*Aspergillus ochraceus*, *Penicillium viridicatum*) и депонированы в коллекциях ATCC, NRRL и CMI. Исследования токсинообразования этого микотоксина провели на 13 изолятах *Aspergillus ochraceus* и 40 изолятах *Penicillium* sp. Выращивание проводили при +25°C в течение 14 суток в микологических пробирках вместимостью 50 мл, содержащих по 5,0 г риса и 2,0 мл воды, добавленной перед автоклавированием. Для инокуляции использовали по 0,25 мл гомогенной взвеси 7-10-суточной культуры гриба на агаре Чапека в 0,01 %-ном водном растворе твина 20. По окончании культивирования образцы мицелиально-зерновой биомассы гомогенизировали с 10 мл смеси ацетонитрил: вода (6:1), выдерживали 14 часов при комнатной температуре, вновь интенсивно перемешивали и фильтровали через бумажный фильтр. Полученные экстракты анализировали на содержание охратоксина А методами ИФА и комбинированной ТСХ-флуориметрии. Все изоляты *Aspergillus ochraceus* были способны к биосинтезу охратоксина А. Два из них образовывали токсин в количествах 48,6 и 98,0 мг/кг. Первый *A. ochraceus* № 343-4/36 был выделен в 1995 году из комбинированных кормов с достаточно высоким уровнем загрязнения 0,4 мг/кг. Второй - *A. ochraceus* № 136, был получен в 1978 году из образца зерновой смеси, который, к сожалению, не удалось проверить на загрязненность охратоксином А. Остальные 11

изолятов из 13 изученных оказались слаботоксигенными, количество токсина в мицелиально-зерновой биомассе составило всего 0,04-1,0 мг/кг.

Все изоляты *Penicillium* sp. были выделены из образцов, в которых предварительно было обнаружено присутствие охратоксина А. При их выделении учитывали два культуральных признака — цвет мицелия (серый, голубой или зеленый) с учетом оттенков и пигментации, а также характер роста мицелия гриба (высокий, низкий, пушистый, гладкий). Способность к образованию токсина была установлена только для 5 изолятов, которые имели мицелий зеленого цвета и различались по форме роста. По предварительной оценке все они относятся к виду *P. viridicatum*. Уровни токсинообразования от 0,06 до 2,4 мг/кг, показанные этими изолятами в эксперименте, были гораздо ниже, чем у депонированных продуцентов этого вида. Между тем известно, что на процесс токсинообразования для *P. viridicatum* воздействие контрастных режимов выращивания при низких температурах оказывает благоприятное влияние, что подтвердили дальнейшие исследования.

Таким образом, способность образовывать охратоксин А на зерновом субстрате была установлена для всех исследованных изолятов вида *A. Ochraceus* и для всех изолятов *Penicillium* sp. с культуральными признаками, свойственными *P. viridicatum*. Уровень токсинообразования у большинства грибов-продуцентов (16 из 18-ти изученных) был низким и находился в диапазоне от 0,04 до 2,4 мг/кг. Только два изолята *A. ochraceus* ВНИИВСГЭ № 343 — 4/36 и *A. ochraceus* ВНИИВСГЭ №173 показали выраженную продуцирующую способность (16).

Запатентован способ получения нового штамма микромицета гриба *Aspergillus flavus* Link-252 обладающего повышенной продуктивностью микотоксина коевой кислоты необходимой как стандарт-свидетель при микотоксикологических исследованиях кормов, пищевых продуктов, культур микромицетов с целью диагностики и профилактики коетоксикоза сельскохозяйственных животных и птицы. Оптимальная температура роста штамма и токсинообразования 30°C, растет и при более низких температурах до 2°C. Коетоксигенный штамм гриба хорошо растет и продуцирует микотоксин на жидких питательных средах. Известны следующие виды микромицетов, способные продуцировать коевую кислоту: *Aspergillus clavatus*, *A. effusus*, *A. flavus*, *A. flavus-oryzae*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. paraciticus*, *A. tamarii*, *A. ustus*, *Penicillium citrinum*, *P. purporogenum*, *P. rubrum*. Однако эти культуры не имеют практического значения для получения микотоксина, так как не изучен их биосинтез, не установлена продуктивность.

При изучении закономерностей накопления коевой кислоты использовали штамм *Aspergillus flavus* путем культивирования на различных зерновых злаках. Однако этот штамм не обладает высокой токсинообразующей активностью, при этом наблюдается низкий выход коевой кислоты, 0,75-3,20 мг/кг в зависимости от вида субстрата. Запатентованный новый штамм *Aspergillus flavus* Link, -252, который был выделен из корма для животных имеет следующие морфологическую и физиологическую характеристики. Оптимальная температура роста штамма 30°C, растет и при более низких температурах до 2°C. Не растет при 52°C. Оптимальная температура токсинообразования 26- 30°C. На жидких питательных средах Чапека, Чапека-Докса, Ролана-Тома, Уилкинсона коетоксигенный штамм гриба хорошо растет и продуцирует микотоксин, также происходит накопление коевой кислоты и на естественных зерновых субстратах

пшенице, ржи, овсе, кукурузе, ячмене и рисе. Полученный штамм хорошо усваивает глюкозу, сахарозу, мальтозу и рафинозу, плохо- сорбит, манит и дульцит.

Гриб-продуцент коевой кислоты *Aspergillus flavus* Link, -252 выращивали на скошенном агаре Чапека в бактериологических пробирках при 30⁰С в течение 5-6 суток. Затем за сутки до планируемой даты заражения грибом продуцентом среды Чапека-Докса с повышенным содержанием глюкозы стерилизовали 5 мин текущим паром. После стерилизации проводили заражение питательной среды конидиями гриба-продуцента (из расчета одна пробирка культуры на шесть-восемь «матрацев» с питательной средой). После чего проводили инкубацию в термостате при 30⁰С в течение 10 - 12 суток. После инкубирования гриба-продуцента культуральную жидкость отделяли от мицелия путем фильтрации через бумажный фильтр. Один литр культуральной жидкости выпаривали на ротационном испарителе под вакуумом при температуре не выше 50⁰С до получения объема 200-300 см³ и помещали в холодильник на 2-3 дня при температуре 0⁰С. По мере охлаждения культуральной жидкости происходило осаждение микотоксина. Осадок отфильтровывали и высушивали под вакуумом. После чего полученный препарат подвергали перекристаллизации. Для этого кристаллы вначале высушивали под вакуумом, а затем в эксикаторе над безводным хлористым кальцием. Из одного литра культуральной жидкости получается свыше 30 г коевой кислоты (17).

Проведена оптимизация среды для выращивания продуцента дикетопиперазинового алкалоида рокефортина, обладающего ярко выраженным нейротоксическим и антибиотическим действием. С санитарно-эпидемиологической точки зрения представляется важным его образование в ряде продуктов питания и кормов. Особое внимание рокефортину уделяется в ветеринарии ввиду токсикозов, вызванных этим метаболитом. При УФ обработки культуры *P.roquefortii* VKMF-2389 был получен штамм *Penicillium roquefortii* f39 с повышенным синтезом рокефортина. Для увеличения выхода микотоксина были оптимизированы состав среды и условия выращивания продуцента. Штамм поддерживали в пробирках со скошенным глюкозо-картофельным агаром (ГКА), либо сусло-агаром (СА). Длительное хранение культур обеспечивалось при 2-4⁰С на скошенном агаре под вазелиновым маслом. Для получения алкалоидов засев жидкой среды проводили спорами 10-ти суточной культуры на агаризованных средах (ГКА, СА) или 3-х суточной глубинной культурой. В опытах в зависимости от выхода рокефортина, от возраста посевного материала использовались пробирки хранившиеся в течение 3-х месяцев при 2-4⁰С. Подсчет засеваемых спор осуществляли в камере Горяева.

Продуцент выращивали в колбах Эрленмейера объемом 750 мл со 150 мл среды Абе, содержащей манит и янтарную кислоту при перемешивании (220-240 об/мин, 24±1⁰С) в течение 5 суток. Алкалоиды выделяли как описано Дудки И.А. и др., 1982. Качественный анализ экстракта осуществляли методом ТСХ в системе СНСГ³: СН₃ОН: 25%-ный NH₄ОН (90:10:0,5). Рокефортин обнаруживали в виде поглощающих в УФ-свете пятен и после опрыскивания пластин реактивом Эрлиха (оранжевая окраска, переходящая со временем в синюю). Количественное определение проводили методом ВЭЖХ. Смесь алкалоидов разделяли на колонке (150 x 3,9 мм), заполненной новапаком C₁₈. Размер частиц 5 мкм, подвижная фаза метанол: вода: 25%-ный раствор аммиака (64:36:0,036), скорость потока 1,5 мл/мин, длина волны 320 нм.

Относительное стандартное отклонение равно 0,08. В результате проведенных исследований был получен рокефортин с выходом всего 10-22 мг/л.

Поскольку различные штаммы одного вида проявляют специфичные требования к содержанию питательных компонентов при росте и продукции вторичных метаболитов – среда Абе, вероятно, оказалась неоптимальной. Дальнейшим шагом выполнения этой работы являлось подобрать оптимальный состав компонентов питательной среды с применением методов математического планирования эксперимента. Поскольку наиболее пригодными для алкалоидообразования субстратами являются маннит и янтарная кислота в концентрации соответственно, 50 и 5,4 г/л- эта среда и была использована в качестве базовой. Результаты исследований свидетельствовали, что существует положительная зависимость накопления биомассы от концентрации питательных компонентов. В то же время в случае продуктивности мицелия (т.е. выхода продукта на единицу биомассы, мг/г) такой взаимосвязи не было установлено.

Помимо вышеперечисленных показателей на выход рокефортина исследовали также в сравнительном плане: 1) особенности использования двух питательных сред – ГКА и СА, 2) использование в качестве инокулюма культур, хранившихся на обеих средах от 1 нед. до 3-х месяцев, 3) глубинной и поверхностной культуры продуцента (споры), 4) количество посевного материала (посевная доза спор). Ни в первом и во втором случае достоверных различий в выходе рокефортина не обнаружено. В то же время применение глубинной культуры штамма f39 в качестве посевного материала позволяло достичь гораздо более высоких концентраций рокефортина, чем при использовании спор продуцента, выращенного на агаризованных средах (18 и 9 мг/л соответственно). Достоверны также различия в количестве биомассы в соответствующих опытах (5,7 и 3,8 г/л). По мнению авторов, повышенная концентрация биомассы и, следовательно, рокефортина при использовании в качестве инокулюма глубинной культуры обусловлены быстрой адаптацией клеток гриба к условиям основной ферментации.

Немаловажным фактором, влияющим на качество инокулюма является количество посевного материала. В качестве посевной дозы спор для культуры *P. roquefortii* обычно используют приблизительно 10^7 - 10^8 КОЕ/л, что соответствует посеву культуры с одной пробирки на колбу с 150 мл среды. В проведенных авторами исследованиях показано, что количество посевного материала во многом определяет концентрацию алкалоида в основной ферментации, в этом случае наблюдалась прямая пропорциональная зависимость. Достаточно высокую концентрацию рокефортина отмечали при посеве $1,3-1,5 \times 10^8$ КОЕ/л культуры. Отмечено также, что на среде Абе биосинтез алкалоидов происходит с высоким выходом биомассы метаболита в отличие от сред с моно- и дисахаридами, где наблюдается обильный рост мицелия, в то время как биосинтез алкалоидов в глубинной культуре подавлен. При использовании в исследованиях преимущества обоих типов субстратов удалось получить среду, способствующую повышенному накоплению рокефортина штаммом *P. Roquefortii* f 39 (18).

Зависимость выхода количества микотоксина фумонизина от штамма гриба была исследована с использованием метода ИФА. Было протестировано 85 штаммов *F. moniliforme*, выделенными из проб зерна кукурузы и исследована их токсиногенность. Пробы зерна с внутренней пораженностью фумонизинами (B1 + B2 + B3) определяли следующим образом: Вначале кукурузу поверхностно стерилизовали в течение 30 сек. с 0,1% раствором сулемы, многократно промывали стерильной водой и 50

зерен высевали на поверхность агара Чапека. Посевы инкубировали 10 суток при 25⁰С в темноте. Затем из выросших колоний методом сухой иглы или разведений выделяли наиболее типичные изоляты грибов рода *Fusarium*, которые в дальнейшем культивировали на агаре Чапека и картофельно-декстрозной среде для последующего определения.

Идентификацию фузариев проводили на основании комплекса микро- и макроморфологических признаков грибов по классификационным схемам Нелсона и Буса. Для определения способности синтезировать ФЗ штаммы культивировали на смеси рисовой и кукурузной крупы (3:1 по весу). В конические колбы емкостью 500 мл вносили 40 г сухой крупяной смеси, добавляли 40 мл воды и автоклавировали при 121⁰С в течение 30 мин. Субстрат инокулировали 1 мл взвеси спор изолятов (примерно 10⁷ спор/мл), предварительно выращенных в течение 10 дней на косяках с агаром Чапека. После инокуляции колбы инкубировали в темноте при 25⁰С в течение 25 суток. Затем культуральный зерновой субстрат подсушивали в термостате при 40⁰С, измельчали на зерновой мельнице и использовали для анализа.

Основным признаком, отличающим *F. moniliforme* от других видов секции *Liseola* является образование микроконидий в длинных цепочках или в ложных головках на простых и разветвленных конидиеносцах, на конидиогенных клетках-монофалидах. Все 85 штаммов отвечали этим требованиям. Однако по макроморфологическим признакам наблюдались значительные вариации, что позволило в дальнейшем разделить выделенные штаммы на три морфологических типа, которые достоверно различались по способности продуцировать фумонизины. Штаммы, отнесенные к мицелиальному типу 1, были наиболее токсиногенны, к пионатальному типу 111- были наименее активными, штаммы спородохиального типа 2 занимали промежуточное положение.

Анализ токсиногенной активности *F. moniliforme* показал, что все исследованные штаммы обладали способностью синтезировать ФЗ, причем интенсивность их образования варьировала в широких пределах от 0,93 до 32500 мг/кг. Преобладающая часть штаммов (72%) была выделена из кукурузы, выращенной в Краснодарском крае; они накапливали максимальное количество ФЗ в субстрате, в среднем 5490 мг/кг. Самыми слабыми продуцентами были штаммы *F. moniliforme*, выделенные из импортированного зерна (1280 мг/кг) (19).

Таким образом, способность штаммов к токсинообразованию определяется множеством факторов. Пригодностью источников углеродного и азотного питания, от продолжительности и способа культивирования, влажностью, температурой и составом субстрата. Для синтеза микотоксинов необходимы углеводы - галактоза, мальтоза, крахмал, азотосодержащие соединения - мочевины, цитрат аммония, аминокислоты - (аланин, глицин, валин, глутаминовая кислота). Существенно влияют на интенсивность образования токсинов минеральные вещества. Избыток серы и железа стимулирует синтез, недостаток - подавляет. Цинк и магний стимулируют, кобальт - полностью подавляют рост микотоксинов.

Список используемых источников:

1. Стародуб Н.Ф., Пилипенко Л.Н., Егорова А.В., Пилипенко И.В. Микотоксин патулин: продуценты, биологическое действие, индикация в пищевых продуктах // *Современные проблемы токсикологии*. 2008. № 3. С. 50-54.

2. Ефимочкина Н.П., Чоха О.А., Пименова В.В., Шевелева С.А. Изучение токсигенных свойств мицелиальных грибов-продуцентов цитринина, выделенных из пищевых продуктов // Вопросы питания. Том 77. № 4. 2008. С. 70-76.
3. Тутельян В.А. Микотоксины (медицинские и биологические аспекты) // Медицина. № 3. 1985. С. 320.
4. Беляева Л.Л., Трмасов М.Я., Байбакова Ю.П. Получение кристаллического микотоксина – патулина // Материалы международной научно-практической конференции «От теории к практике: вопросы современной ветеринарии, биотехнологии и медицины». 2006. Саратов. С. 34-37.
5. Феофилова Е.П. Торможение жизненной активности как универсальный биохимический механизм адаптации микроорганизмов к стрессовым воздействиям // Прикладная биохимия и микробиология. Т. 39. № 1. 2003. С. 5-24.
6. Cigler A., Detrou R.W., Lillehoj E.W. Патулин, пеницилловая кислота и другие канцерогенные лактоны // Прикладная микробиология. Общество микробиологии. Т. 26. № 1. 1973. Р. 124-125.
7. Зябкина Н.Г., Шовгенова С.А., Авгеева Н.М. Пути синтеза патулина и механизмы его взаимодействия с аминокислотами в соке яблок // Новые технологии. 2009. № 1. С. 5.
8. Соколова Г.Д. Энниатины и боверицин-биологически активные метаболиты фитопатогенных видов *Fusarium* // Микология и фитопатология. Т. 42. 2008. С. 97-109.
9. Gunasekaran M. Optimum culture conditions for aflatoxin B2 production by A human pathogenic strain of *aspergillusflavus* // Mycologia. Vol. LXXIII. 1981. Р. 697-704.
10. Токарев С.В., Кононенко Г.П., Соболева Н.А., Буркин А.А. Токсинообразование у популяции *Fusarium* роае, поражающих зерно хлебных злаков в уральском и западно-сибирском регионах // Сельскохозяйственная биология. 2009. № 1. С. 89-92.
11. Котик А.Н., Чернобай В.Т., Комисаренко Н.Ф., Труфанова В.А. Выделение микотоксина *Fusarium sporotrichiella* и изучение его физико-химических и токсических свойств // Микробиологический журнал. 1979. Т. 41. № 6. С. 636-639
12. Труфанова В.А., Котик А.Н. Селекция штаммов штаммов *Fusarium Sporotrichioides*-продуцентов Т-2 токсина, зеараленона и ауорофузарина // Успехи медицинской микологии. 2001. Т. 1. Глава 4. С. 181.
13. Буркин А.А., Пирязева Е.А., Малиновская Л.С., Кононенко Г.П. Метаболический профиль грибов рода *Fusarium* MLK: потенциал биосинтеза Т-2 токсина и диацетоксисцирпенола // Успехи медицинской микологии. Материалы 4-го Всероссийского конгресса по медицинской микологии. 2006. Том 6. Глава 4. С. 9.
14. Зайченко А.М., Рубежнюк И.Г., Кобзистая О.П. Макроциклические трихотеценовые микотоксины – продуценты, распространение, определение, физиология токсинообразования, токсигенный потенциал // Современные проблемы токсикологии. 2001. № 2. С. 5-12.
15. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Кислякова О.С. Актуальность изучения проблемы охратоксикоза в России // Успехи медицинской микологии. 2002. Т. 1. Гл. 4. С. 123-144
16. Волков Н.В. Патент 2046137 от 20.10.1995 Институт ветеринарной медицины.
17. Бойченко Д.М., Зеленкова Н.Ф., Аринбасаров М.У., Решетилова Т.А. Оптимизация среды и условий культивирования *Penicillium roquefortii* 39 – продуцента дикетопиперазинового алкалоида рокефортина // Прикладная биохимия и микробиология. 2002. Том 38. № 3. С. 257-260
18. Львова Л.С., Седова И.Б., Кизленко О.И., Тутельян В.А. Образование фумонизинов штаммами *Fusarium moniliforme*, выделенными из зерна кукурузы // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Том 39. № 2. С. 222-227

References:

1. Starodub N.F., Pilipenko L.N., Egorova A.C., Pilipenko I.V. The mycotoxin patulin: producers, biological action, indication in food // Modern problems of toxicology. 2008. N 3. P. 50-54.
2. Efimochkina N.P., Chokha O.A., Pimenov V.V., Sheveleva S.A. The study of toxigenic properties of filamentous fungi-producers citrinin isolated from food // nutrition. Vol. 77. N 4. 2008. P. 70-76.
3. Tutelian C.A. Mycotoxins (medical and biological aspects) // Medicine. N 3. 1985. P. 320.
4. Belyaev L.L., Tremasov M.J., Baibakov Y.P. Obtaining crystalline mycotoxin - penicidin // Materials of international scientific-practical conference "From theory to practice: issues in modern veterinary medicine, biotechnology and medicine". 2006. Saratov. P. 34-37.
5. Feofilova E.P. Inhibition of vital activity as a universal biochemical mechanism of adaptation of microorganisms to stress // Applied biochemistry and Microbiology. Vol. 39. N 1. 2003. P. 5-24.
6. Cigler A., Detrou R.W., Lillehoj E.W. Patulin, penicillata acid and other carcinogenic lactones // Applied Microbiology. Society of Microbiology. Vol. 26. N 1. USA. 1973. P. 124-125.

7. Sabrina N.G., Shogenova S.A., Ageeva N.M. The way of synthesis of penicidin and the mechanisms of its interaction with amino acids in the juice of apples // *New technologies*. 2009. N 1. P. 5.
8. Sokolov D. Anatini and bamerican-biologically active metabolites of phytopathogenic *Fusarium* species // *Mycology and Phytopathology*. Vol. 42. 2008. P. 97-109.
9. Gunasekaran M. Optimum culture conditions for aflatoxin on B2 production by A human pathogenic strain of *aspergillusflavus* // *Mycologia*. Vol. LXXIII. 1981. P. 697-704.
10. Tokarev S.C., Kononenko G.P., Sobolev N.A., Burkin A.A. Toxicobrain the population of *Fusarium poae* affecting cereal grains in the Urals and West Siberian regions // *Agricultural biology*. 2009. N 1. P. 89-92.
11. Kotik A.N., Chernobay V.T., Komisarenko N.F., Trufanova V.A. The selection of the mycotoxin of *Fusarium sporotrichiella* and study of its physicochemical and toxic properties // *journal of Microbiological*. 1979. Vol. 41. N 6. P. 636-639.
12. Trufanova V.A., Kotik A.N. Selection of strains of strains of *Fusarium Sporotrichioides*-producers of T-2 toxin, zearalenone and aurofusarin // *Advances in medical Mycology*. 2001. Vol. 1. Ch. 4. P. 181.
13. Burkin A.A., Parasiva E.A., Malinowskaya L.S., Kononenko G.P. Metabolic profile of fungi of the genus *Fusarium* MLK: the potential of the biosynthesis of T-2 toxin and diacetoxyscirpenol // *Advances in medical Mycology. The proceedings of the 4th all-Russian Congress on medical Mycology*. 2006. Vol. 6. Ch. 4. P. 9.
14. Zaichenko A.M., Rubinek I.G., Conbzystayza O.P. Macrocyclic trichothecene mycotoxins - producers, distribution, identification, physiology coccinobaphi toxigenic potential // *Modern problems of toxicology*. 2001. N 2. P. 5-12.
15. Burkin A.A., Konochenko G.P., Kislyakova O.C. Relevance of the study of the problem of ochratoxicosis in Russia // *Advances in medical Mycology*. 2002. Vol. 1. Ch. 4. P. 123-144.
16. Volkov N.V. Patent 2046137 from 20.10.1995 Institute of veterinary medicine.
17. Boychenko D.M., Zelenkova N.F., Arinbasarova M.U., Reshetilov T.A. Optimization of medium and cultivation conditions *Penicillium rouefortii* 39 - producer diketopiperazine alkaloid roquefortine // *Applied biochemistry and Microbiology*. 2002. Vol. 38. N 3. P. 257-260.
18. Lviv L.S., Sedova I.B., Kislenko O.I., Tutelian V.A. Education fumonisins strains of *Fusarium moniliforme* isolated from corn // *Applied biochemistry and Microbiology in 2003*. Vol. 39. N 2. P. 222-227.

© 2015, Беляева Л.Л., Танасева С.А.

Условия роста мицелиальных грибов и биосинтез микотоксинов

© 2015, Belyaeva L.L., Tanaseva S.A.

Terms of growth of filamentous fungi and mycotoxin biosynthesis