

ХАРАКТЕРИСТИКА ТОКСИГЕННЫХ СВОЙСТВ *MYROTHECIUM CINCTUM* (CORDA) SACC., 1886 И *MYROTHECIUM COMMUNE* PIDOPL., 1969

Проведено сравнительное изучение токсигенного потенциала *Myrothecium cinctum* (12 штаммов) и *Myrothecium commune* (7 штаммов). Оценивали способность к образованию комплекса макроциклических трихотеценов (МЦТЦ), представленных в спирторастворимой фракции (СРФ), а также фунгистатическую активность в отношении дрожжевых тест-систем (*Saccharomyces vini* штамм «Феодосия» и *Candida stellatoidea* 63) и кожную пробу на кролике.

Установлено, что выход СРФ колеблется в довольно широких пределах как у изученных штаммов *M. cinctum*, так и у *M. commune*, хотя выход СРФ последних был существенно ниже. Более высокие выходы СРФ, как правило, сопровождалась и более высокой фунгистатической активностью и кожной реакцией кроликов. У отдельных штаммов отмечали высокую биологическую активность при незначительных выходах СРФ, что, по-видимому, обусловлено преобладанием в препаратах более токсичных компонентов комплекса.

Изучение компонентного состава МЦТЦ при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) показало, что, за немногим исключением, он представлен веррукаринами А и J, роридинами А, Е и Н, а также неидентифицированными компонентами с временем удержания на колонке 2,1 и 4,9 мин.

Для штаммов *M. cinctum* было характерным образование в качестве основного метаболита роридина Н и неидентифицированного компонента с временем удержания 2,1 мин., в то время как для изученных штаммов *M. commune* – веррукарина А и неидентифицированного компонента с временем удержания 4,9 мин., соответственно.

Предполагается, что эти различия, наряду с морфолого-культуральными особенностями, могут быть использованы в качестве дополнительного критерия при видовой дифференциации штаммов *M. cinctum* и *M. commune*.

Ключевые слова: *Myrothecium cinctum*, *Myrothecium commune*, макроциклические трихотецены, токсигенный потенциал, биологическая активность.

Токсигенные свойства представителей р. *Myrothecium*, и особенно *Myrothecium verrucaria* (Alb. & Schwein.) Ditmar., 1813 и *Myrothecium roridum* Tode, 1790, обстоятельно изучены и опубликованы в ряде работ [5-12]. Однако, в доступной литературе отсутствуют сведения относительно токсигенного потенциала, как и других свойств, штаммов *Myrothecium cinctum* и *Myrothecium commune*, хотя они и представлены довольно широко в различных эконисах.

Ранее [13] нами были изучены некоторые культуральные свойства представителей этих видов. В данной работе мы предприняли попытку исследования их токсигенных свойств.

Материалы и методы. Объектами исследования были 19 штаммов грибов, из которых 12 – *M. cinctum* и 7 – *M. commune*. Выделение и идентификация культур проводились различными исследователями, и в наше распоряжение они были любезно предоставлены главным образом из музея отдела физиологии и систематики микромицетов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины.

Изученные штаммы были выделены из почвы, ризосферы сельскохозяйственных растений, а также различных растительных остатков.

Штаммы культивировали в 1 л колбах Эрленмейера, содержащих 0,1 л среды при температуре 27–28 °С в течение 12 суток. Глюкоза (20 г/л) была использована в качестве единственного источника углерода, а KNO_3 (1 г/л) – в качестве источника азота, рН среды 5,2 [1]. Среда инокулировали при помощи суспензии конидий, полученных путем смыва 1-месячной культуры на агаризованной среде. Плотность засева $1,2 \times 10^6$ клеток.

Экстракцию микотоксинов осуществляли при помощи хлороформа в соотношении 1 : 5 трижды по 15 мин. Экстракты объединяли, упаривали под вакуумом, и проводили их предварительную очистку согласно методики, описанной ранее [3].

О биологической активности комплексных препаратов судили на основании их фунгистатической активности в отношении *Saccharomyces vini* (штамм «Феодосия») и *Candida stellatoidea* 63, а также на основании результатов кожной пробы на кролике [1].

Качественный состав и количественное содержание индивидуальных компонентов макроциклических трихотеченов исследуемых культур изучали в экстрактах зерна (просо) после культивирования грибов на хроматографе «Altex» (модуль 336) с использованием колонки «Ultrasphaera-Si» и УФ-детектора со сменной длиной волны (263 нм). В качестве подвижной фазы использовали систему растворителей н-гексан : изопропанол : вода (80 : 28 : 2).

Количественную оценку содержания макроциклических трихотеченов проводили на основании сравнения времени удержания и площадей пиков анализируемых образцов относительно стандартов исследуемых микотоксинов. В качестве стандартов использовали кристаллические образцы макроциклических трихотеченов фирмы «Sigma» (США). Площади хроматографических пиков вычисляли при помощи интегратора «Shimadzu» (Япония).

Экстракт из 10 г зерна растворяли в 1 мл хлороформа, отбирали 100 мкл и наносили (с целью дополнительной очистки) на миниколонку «Silica» и промывали 0,6–0,7 мл диэтилового эфира. Затем образец упаривали досуха в токе азота, растворяли в 2 мл диэтилового эфира и вводили в хроматограф в количестве 5 мкл.

Результаты. Как видно из данных, представленных в табл. 1, выход спирторастворимой фракции (СРФ), представленной комплексом макроциклических трихотеченовых микотоксинов (МЦТЦ), колеблется в широких пределах как у изученных штаммов *M. cinctum*, так и *M. commune*. Более высокие выходы характерны для штаммов *M. cinctum* (штаммы 2629, 8882 и 9465 образуют от 41,5 до 66,3 мг/л). У изученных штаммов *M. commune* выходы СРФ были существенно ниже, и более активные штаммы синтезировали от 13,9 до 19,8 мг/л.

Таблица 1
Выход (мг/мл) спирторастворимой фракции и биологическая активность исследуемых штаммов *M. cinctum* и *M. commune*

№.№ штаммов	Выход спирторастворимой фракции, мг/л	Биологическая активность		
		Ø стерильной зоны (мм)		Кожная проба (степень)
		<i>S. vini</i>	<i>C. stellatoidea</i>	
<i>M. cinctum</i>				
7	8,1	7	9	—**
461	12,0	19	19	III
538	12,6	12	12	—
7629	61,6	20	20	III
7654	11,7	10	11	—
7695	18,4	10	10	I
7728	12,1	9	8	—
8881	14,7	13	14	±***
8882	66,3	17	16	II
9356	9,9	8	8	—
9465	41,5	10	10	—
52380	21,8	17	17	III
<i>M. commune</i>				
51300	8,8	15	15	II
52002	11,3	0*	0	0
52074	6,2	9	8	0
52582	19,8	19	20	II
55192	6,6	16	16	I
56888	7,4	8	8	III
59183	13,9	10	17	III

Примечание: 0 - активность отсутствует;

— не изучали;

± реакция не четко выражена

Более высокие выходы СРФ, как правило, сопровождалась и более высокой фунгистатической активностью в отношении исследуемых тест-систем. Однако, для *M. cinctum* 461 и *M. commune* 51300 и 55192 была характерной высокая активность при незначительных выходах СРФ, что, по-видимому, обусловлено преобладанием в препарате более токсичных компонентов МЦТЦ.

Фунгистатическая активность препаратов СРФ, как правило, хорошо согласовывалась с результатами кожной пробы на кроликах.

Биологическая активность СРФ определяется не только ее количественным содержанием, но и соотношением компонентов МЦТЦ в комплексе. Известно [4], что ЛД₅₀ различных компонентов МЦТЦ существенно различается, в связи с чем представляет интерес изучение их качественного состава и количественного содержания.

Результаты этих исследований представлены в табл. 2, из которой можно видеть, что комплекс МЦТЦ, за немногим исключением, представлен 7 компонентами (веррукарин А и J, роридины А, Е и Н, а также неидентифицированные компоненты макроциклической природы с временем удержания на колонке 2,1 и 4,9 мин., соответственно). Характерно, что 3 штамма *M. cinctum* и 4 штамма *M. commune* не образуют роридина Е. Интересно отметить также, что для изученных штаммов *M. cinctum* более характерно образование неидентифицированных компонентов с временем удержания 2,1 мин. (9 штаммов из 12), а для штаммов *M. commune* – неидентифицированных компонентов с временем удержания на колонке 4,9 мин. (5 штаммов из 7).

Таблица 2

Содержание некоторых макроциклических трихотеценов (в мг/кг) при культивировании исследуемых штаммов на просе

№№ штаммов	Идентифицированные макроциклические трихотецены					Суммарное содержание	Неидентифицированные МЦТЦ с временем удержания на колонке (мин)	
	RH	VJ	VA	RE	RA		2,1	4,9
<i>M. cinctum</i>								
7	1,12	0	4,03	0,52	2,70	8,37	+	-
461	3,44	0,96	8,81	0,36	1,11	14,68	+	-
538	9,42	9,33	5,67	7,34	2,05	33,81	-	+
7629	45,17	19,20	21,87	13,75	2,53	102,52	+	-
7654	37,03	14,52	19,06	0	1,91	72,52	+	+
7695	29,14	16,80	17,52	0	3,08	66,54	-	+
7728	4,88	7,53	6,12	0,22	0,94	19,69	-	-
8881	13,66	18,51	16,54	1,77	1,26	51,74	+	-
8882	15,01	1,06	51,44	0	13,50	81,01	+	-
9356	24,71	18,54	20,08	0,18	7,70	71,21	+	+
9465	19,90	14,51	17,58	2,36	4,81	59,16	+	+
52380	17,58	12,03	14,06	0	3,48	47,15	+	-
<i>M. commune</i>								
51300	3,42	4,56	17,10	7,18	4,31	36,57	-	+
52002	7,18	9,40	12,30	4,48	9,62	42,98	-	+
52074	6,66	5,14	11,81	0	2,43	26,04	-	+
52582	8,13	5,12	16,42	0	1,54	34,21	-	+
55192	10,70	7,60	18,32	0	3,16	39,76	-	+
56888	11,12	7,17	14,81	2,44	5,77	41,27	+	-
59183	12,43	5,94	11,57	0	4,34	34,28	-	-

Примечание: + наличие компонента; - компонент отсутствует;

RH - роридин Н; VJ - веррукарин J; VA - веррукарин А;

RE - роридин Е; RA - роридин А

В качестве основного метаболита у штаммов *M. cinctum* чаще обнаруживается роридин Н (7 штаммов из 12), реже – веррукарин А (3 штамма) и веррукарин J (2 штамма). В то же время основной метаболит у изученных штаммов *M. commune* представлен веррукарином А (6 штаммов из 7).

Таким образом, исследуемые штаммы *M. cinctum* и *M. commune* имеют существенные различия по ряду показателей токсигенного потенциала, касающихся компонентного состава МЦТЦ, их количественного содержания и, соответственно, биологической активности.

Обсуждение. Как уже отмечалось, токсигенный потенциал видов *M. verrucaria* и *M. roridum* обстоятельно рассмотрен и представлен в ряде публикаций [5-12, 14]. В то же время, подобного рода работы в отношении исследуемых видов, за немногим исключением [13], отсутствуют.

Ранее [2] нами на основании изучения способности к синтезу МЦТЦ представителей рр. *Dendrodochium*, *Stachybotrys* и *Myrothecium* было сформулировано заключение о том, что такая особенность является характерной и общей для представителей этих родов. Не выпадают из этой закономерности и изученные нами виды – *M. cinctum* и *M. commune*, которые образуют и проявляют биологическую активность, свойственную этим соединениям.

В то же время, нельзя не заметить и некоторых характерных особенностей изученных видов: различий в метаболитах, выступающих в роли основных, различий в составе неидентифицированных компонентов и др., которые, как нам кажется, наряду с морфолого-культуральными свойствами, могут быть использованы в качестве дополнительных критериев при их видовой дифференциации.

О.М. Зайченко, К.С. Циганенко, О.В. Андриенко, Я.І. Савчук

Институт мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ХАРАКТЕРИСТИКА ТОКСИГЕННЫХ ВЛАСТИВОСТЕЙ *MYROTHECIUM CINCTUM* (CORDA) SACC., 1886 ТА *MYROTHECIUM COMMUNE* PIDOPL., 1969

Резюме

Проведено порівняльне вивчення токсигенного потенціалу *Myrothecium cinctum* (12 штамів) і *Myrothecium commune* (7 штамів). Оцінювали здатність до утворення комплексу макроциклічних трихотеценів (МЦТЦ), представлених в спирторозчинній фракції (СРФ), а також фунгістатичну активність щодо дріжджових тест-систем (*Saccharomyces vini* штам «Феодосія» і *Candida stellatoidea* 62) і шкірну реакцію на кролику.

Встановлено, що вихід СРФ коливається в досить широких межах, як у досліджуваних штамів *M. cinctum*, так і у *M. commune*, хоча вихід СРФ останніх був суттєво нижчим. Більш високі виходи СРФ, як правило, супроводжувались і більш високою фунгістатичною активністю і шкірною реакцією кроликів. У окремих штамів відзначали високу біологічну активність при незначних виходах СРФ, що, напевне, обумовлено переважанням в препаратах більш токсичних компонентів комплексу.

Вивчення компонентного складу МЦТЦ за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) показало, що, за несуттєвим виключенням, він представлений веррукаринами А і J, роридинами А, Е і Н, а також неідентифікованими компонентами з часом утримання на колонці 2,1 і 4,9 хв.

Для штамів *M. cinctum* було характерним утворення як основного метаболіту роридину Н та неідентифікованого компоненту з часом утримання 2,1 хв., в той час як для досліджуваних штамів *M. commune* – веррукарину А та неідентифікованого компоненту з часом утримання 4,9 хв., відповідно.

Передбачається, що ці відмінності, поряд із морфолого-культуральними особливостями, можуть бути використані як додаткові критерії при видовій диференціації штамів *M. cinctum* і *M. commune*.

К л ю ч о в і с л о в а: *Myrothecium cinctum*, *Myrothecium commune*, макроциклічні трихотецени, токсигенний потенціал, біологічна активність.

A.M. Zaichenko, E.C. Tsyganenko, E.V. Andrienko, Ya.I. Savchuk

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

CHARACTERISTICS OF TOXIGENIC PROPERTIES OF *MYROTHECIUM CINCTUM* (CORDA) SACC., 1886 AND *MYROTHECIUM COMMUNE* PIDOPL., 1969

S u m m a r y

The comparative study of toxigenic potential of *Myrothecium cinctum* (12 strains) and *Myrothecium commune* (7 strains) was conducted. The ability to produce the complex of macrocyclic trichothecenes (MCTC)

presented in ethanol soluble fraction (ESF), as well as fungistatic activity against yeasts test-cultures (strains *Saccharomyces vini* "Feodosia" and *Candida stellatoidea* 62) and rabbit skin test were evaluated.

It was established that ESF output varied within wide limits in all studied strains of both species but it was significantly lower in *M. commune* strains. Higher ESF yields were accompanied as a rule by higher fungistatic activity and skin reaction in rabbits. The separate strains showed high biological activity with minor ESF output that could be possible caused by domination of more toxic components in complex preparation.

The study of MCTC component structure by high performance liquid chromatography method (HPLC) showed with a few exceptions the presence of verrucarins A and J, roridins A, E, and H as well as unidentified components whose column retention times were 2.1 and 4.9 minutes.

The production of roridin H and unknown component with 2.1 min. retention time was typical of *M. cinctum* strains while verrucarins A and unidentified component with 4.9 min. retention time was typical of *M. commune* strains.

It is expected that these differences together with morphologically-cultural properties can be used as additional criteria for species identification of *M. cinctum* and *M. commune* strains.

The paper is presented in Russian.

К е у в о р д: *Myrothecium cinctum*, *Myrothecium commune*, macrocyclic trichothecenes, toxigenic potential, biological activity.

Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s: *Zaichenko O.M.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. *Билай В.И., Пидопличко Н.М.* Токсикообразующие микроскопические грибы. – Киев: Наук. думка, 1970. – 289 с.
2. *Зайченко А.М.* Биосинтез дендродохинов микроскопическими грибами: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Киев, 1989. – 47 с.
3. *Рубежняк И.Г.* Веррукарин А из конидий *Dendrodochium toxicum* Pidopl. et Bilai // Микробиол. журн. – 2001. – **63**, № 2. – С. 10–13.
4. *Bamburg J.R.* Biological and biochemical actions of trichothecene mycotoxins // Progr. Mol. and Subcell. Biol. – 1983. – **8**, N 1. – P. 41–110.
5. *Böhner B., Fetz E., Härrli E.* et al. Verrucarins and roridins. VIII. Über die isolierung von verrucarins H, verrucarins J, roridin D und roridin E aus *Myrothecium*-arten // Helv. chim. acta. – 1965. – **48**, N 5. – S. 1079–1087.
6. *Breitenstein W., Tamm Ch.* Verrucarins K, the first natural trichothecene derivative lacking the 12,13-epoxy group. 34 Communication // Ibid. – 1977. – **60**, N 5. – P. 1522–1527.
7. *Fernando T., Bean G.* Production of the trichothecene mycotoxins on cereal grains by *Myrothecium* spp. // Food Chem. – 1986. – **20**, N 3. – P. 235–240.
8. *Härrli E., Loeffler W., Sigg H.P.* et al. Über die verrucarine und roridine, eine gruppe von cytostatisch hockwirksamen antibiotica aus *Myrothecium*-arten // Helv. chim. acta. – 1962. – **45**, N 3. – S. 839–853.
9. *Jarvis B.B., Stahly G.P., Pavanasisivam G.* et al. Structure of roridin J, a new macrocyclic trichothecene from *Myrothecium verrucaria* // J. Antibiot. (Tokyo). – 1980. – **33**, N 2. – P. 256–258.
10. *Kobayashi M., Kanasaki R., Ezaki M.* et al. FR227244, a novel antifungal antibiotic from *Myrothecium cinctum* № 002. I. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical properties // Ibid. – 2004. – **57**, N 12. – P. 780–787.
11. *Li X., Kim M.K., Lee U.* et al. Myrothenones A and B, cyclopentenone derivatives with tyrosinase inhibitory activity from the marine-derived fungus *Myrothecium* sp. // Chem. Pharm. Bull. – 2005. – **53**, N 4. – P. 453–455.
12. *Namikoshi M., Akano K., Merugo S.* et al. A new macrocyclic trichothecene, 12,13-deoxyroridin E, produced by the marine-derived fungus *Myrothecium roridum* collected in Palau // J. Nat. Prod. – 2001. – **64**, N 3. – P. 396–398.
13. *Zaichenko A.M., Kirillova L.M., Rubezhnyak I.G., Andrienko E.V.* Comparative characteristics of some cultural and toxigenic properties of the *Dendrodochium* Bonorden and *Myrothecium* Tode ex Fr. representatives // Микробиол. журн. – 1997. – **59**, N 3. – С. 33–41.
14. *Wagenaar M.M., Clardy J.* Two new roridins isolated from *Myrothecium* sp. // J. Antibiot. (Tokyo). – 2001. – **54**, N 6. – P. 517–520.

Отримано 5.11.2012