

ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ, БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 579.67: 579.8: 664

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *ASPERGILLUS* – КОНТАМИНАНТОВ ЗЕЛЕННОГО КОФЕ НА ОСНОВЕ ПОЛИФАЗНОЙ ТАКСОНОМИИ

© 2023 г. Л. П. Минаева^{1,*}, Ю. М. Маркова^{1,**}, А. Д. Евсюкова^{1,***},
И. Б. Седова^{1,****}, З. А. Чалый^{1,*****}

¹Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, 109240 Москва, Россия

*e-mail: liuminaeva-ion@mail.ru

**e-mail: yulia.markova.ion@gmail.com

***e-mail: st.shtolz@gmail.com

**** e-mail: isedova1977@mail.ru

***** e-mail: tokka66@bk.ru

Поступила в редакцию 27.10.2022 г.

После доработки 05.11.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Грибы рода *Aspergillus* широко распространены в окружающей среде, способны расти при высоких температурах и минимальной влажности, в том числе в регионах с жарким тропическим климатом, отдельные виды *Aspergillus* обладают потенциалом токсинообразования. Это определяет риск контаминации грибами рода *Aspergillus* и продуцируемыми ими микотоксинами (МТ) растительного сырья и пищевой продукции, что возможно на любом этапе производства, транспортировки и хранения. В объеме импортируемого в РФ кофе, 85% приходится на сырье – зеленый кофе, для которого сохраняются риски поражения плесневыми грибами на всех стадиях, предшествующих стадии обжарки. Актуально исследование видового состава и токсиногенных свойств *Aspergillus* spp., контаминирующих сырье для производства пищевой продукции массового потребления, к которой, в том числе, относится кофе, входящий в число базовых продуктов потребительской корзины. Достоверные данные видовой идентификации и токсиногенного потенциала микромицетов могут быть получены только при комплексном подходе на основе полифазной таксономии. Цель представленной работы – изучение видового состава грибов рода *Aspergillus*, выделенных из зеленого кофе, с применением комплексного подхода на основе полифазной таксономии. Проведено изучение видового состава грибов рода *Aspergillus* из внутренней микофлоры 16 образцов зерен зеленого кофе сортов арабика и робуста. Видовая принадлежность выделенных 34 моноспоровых изолятов *Aspergillus* spp. определена культурально-морфологическими методами и подтверждена при молекулярно-генетическом анализе – ПЦР-РВ с ДНК-маркерами консервативных последовательностей (ITS, Calmodulin, β -tubulin), в условиях *in vitro* изучен профиль продуцируемых вторичных токсических метаболитов. Установлено доминирование видов секции *Niger* – *A. niger* (90%), *A. tubingensis*, *A. carbonarius*; далее в порядке уменьшения следовали виды секции *Flavi* – *A. flavus* (100%); секции *Circumdati* – *A. ochraceus* (40%) и *A. westerdijkiae* (60%); в секцию *Fumigati* был выделен один штамм *A. fumigatus*. Анализ профиля токсических метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме мультidetекции показал продукцию микотоксинов видами: *A. niger* – фумонизина В2 и охратоксина А, *A. flavus* – афлатоксинов В1 и В2 совместно со стеригматоцистином, *A. westerdijkiae* – охратоксина А и пеницилловой кислоты, *A. ochraceus* – пеницилловой кислоты. Количества продуцируемых МТ показывают высокий токсиногенный потенциал *Aspergillus* spp. – контаминантов зеленого кофе. Так 20 из 34 штаммов продуцировали в значительных количествах опасные, регламентируемые микотоксины: АФЛ В1, ОТА, ФВ2. Нетоксиногенные изоляты были представлены видами *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. flavus* и *A. fumigatus*. Изучение видового состава и токсиногенных свойств грибов рода *Aspergillus* – контаминантов зеленого кофе с применением полифазного подхода проведено в России впервые.

Ключевые слова: *Aspergillus*, ВЭЖХ-МС/МС, кофе, микотоксины, полифазная таксономия, ПЦР, токсиногенность, эмерджентные микотоксины

DOI: 10.31857/S0026364823030078, EDN: VCPMMC

ВВЕДЕНИЕ

Грибы рода *Aspergillus* имеют повсеместное распространение в окружающей среде, способны

расти на широком спектре растительных субстратов, в широком диапазоне температур и влажности, а высокие скорости роста и распространения

спор *Aspergillus* spp. обеспечивает их доминирование в различных экологических нишах. При этом отдельные виды *Aspergillus* spp. являются продуцентами как опасных, нормируемых в пищевой продукции и сырье, микотоксинов (МТ) — афлатоксинов (B1, B2, G1, G2), охратоксина А, фумонизинов (B2, B4), так и новых, так называемых — эмерджентных (emergent) МТ: стеригматоцистина, циклопиазоновой кислоты, значение которых с точки зрения опасности для здоровья человека в настоящее время изучается, и в отношении которых отсутствуют регламенты безопасности в пищевой продукции. Все эти факторы во многом определяют высокий риск загрязнения пищевой продукции на всех этапах ее производства от сырья до конечного продукта, как грибами рода *Aspergillus*, так и продуцируемыми ими микотоксинами. Для оценки контаминации продуктов МТ и научного обоснования эффективных путей минимизации их негативного воздействия на организм человека необходимо изучение видового состава и токсиногенного потенциала микромицетов в продукции, характеризующейся высокой степенью риска поражения плесенью. Одним из таких видов продукции является кофе, при производстве которого наиболее уязвимыми с точки зрения безопасности являются послеуборочные этапы сушки и ферментации плодов в естественных климатических условиях за счет собственной микрофлоры, включающей в том числе микромицеты — потенциальные продуценты МТ. Проблема контаминации кофе опасным охратоксином (ОТА) побудила Научный комитет Европейской комиссии по пищевым продуктам провести оценку риска и признать необходимость контроля ОТА в кофе. Было отмечено, что кофе входит в группу продуктов питания, являющихся основными источниками поступления ОТА в организм человека с пищей (Commission., 2006). Актуальность изучения определяется и тем, что в объеме импортируемого в РФ кофе, 85% приходится на сырье — необработанный зеленый кофе (Iratova, 2020), для которого сохраняются риски поражения плесневыми грибами на стадиях транспортировки и хранения, предшествующие стадиям обжарки.

Идентификация микромицетов рода *Aspergillus* до уровня вида является сложной задачей в силу высокого сходства морфологических структур отдельных видов, неоднородности подходов к таксономии грибов, накоплением новых данных молекулярно-генетических исследований, отражающих сложность эволюционных процессов в формировании видов, поэтому не существует простых стратегий для однозначной их идентификации (Grube et al., 2017; Inderbitzin et al., 2020). Созданная ранее и используемая на протяжении многих десятилетий таксономическая система микроскопических грибов, основанная на морфологических характеристиках, в последнее время претерпевает

кардинальные, а для некоторых видов революционные изменения. Применение методов на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС) в формате мультidetекции позволило выявить видоспецифичный характер метаболитных профилей микромицетов, что обусловило появление хемотаксономии. Объем накопленных данных позволил провести более глубокую видовую и родовую дифференциацию, в результате чего многие морфологически схожие изоляты грибов, в частности рода *Aspergillus*, рассматриваемые ранее как представители одного вида, были реклассифицированы и отнесены к группе или комплексу видов. Так понимание вида *Aspergillus niger* было расширено до комплекса *Aspergillus* секции *Nigri* (*A. niger*, *A. welwitschiae*, *A. tubingensis*, *A. carbonarius* и др., всего 19 видов) (Samson et al., 2007), а вида *A. flavus* — до комплекса *Aspergillus* секции *Flavi* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. pseudotamarii*, *A. togoensis*, *A. aflatoxiformans* и др., всего 33 вида) (Hubka et al., 2019). Надежные данные видовой идентификации микромицетов могут быть получены только при использовании комплексного подхода на основе полифазной таксономии, включающего изучение фенотипических, молекулярно-генетических и хемотаксономических характеристик микромицетов с учетом их происхождения.

Цель представленной работы — изучение видового состава грибов рода *Aspergillus*, выделенных из зеленого кофе, с применением комплексного подхода на основе полифазной таксономии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Штаммы грибов рода *Aspergillus*, выделенные из 16 образцов зерен зеленого кофе сортов арабика и робуста, выращенных в регионах Африки, Юго-Восточной Азии, Центральной и Южной Америки, были получены из розничной сети Московского региона (табл. 1).

Выделение изолятов микромицетов. От каждого образца зеленого кофе отбирали по 10 зерен, поверхность стерилизовали в 70%-м этаноле, просушивали и раскладывали в чашки Петри на картофельно-сахарозный агар (КСА) с добавлением антибиотика (стрептомицин 200 мг/л, ОАО “Синтез”, Курган) и Тритона TMX-100 (0.5%, Sigma-Aldrich) (Gagkaeva, et al., 2011). Посевы инкубировали 7 сут при 24 ± 1°C в темноте. Выросшие из кофейных зерен микромицеты отсеивали на среду КСА для последующих расщепов до получения моноспоровых изолятов (МСИ), всего был выделен 34 МСИ.

Фенотипическая идентификация МСИ. Проведена по результатам культуральных и морфологических исследований в соответствии с рекомендованной схемой (Samson et al., 2014). Скорость ро-

ста грибов при температурах 15, 24, 36 и 40°C на агаризованной среде Чапека с дрожжевым экстрактом (СЧА) определяли по размеру колоний через 7 сут; кислотообразование оценивали на креатинин-сахарозном агаре (CREA) через 5–7 сут при $24 \pm 1^\circ\text{C}$; макроморфологию колоний (цвет мицелия и реверса, споруляцию и др.) и микроморфологические характеристики (форма конидиальных головок, размер и форма конидий и др.) отмечали при выращивании на среде СЧА при $24 \pm 1^\circ\text{C}$ через 7 сут. По совокупности признаков определяли принадлежность к виду, а для морфологически схожих видов указывали на принадлежность к секции видов (Samson et al., 2007; Jurjevic et al., 2012; Samson et al., 2014; Visagie et al., 2014; Frisvad et al., 2019).

Экстракция ДНК. Проведена с использованием набора Проба-ЦТАБ (ООО “Агро-Диагностика”). Культуры грибов выращивали на картофельно-сахарозном бульоне (КСБ) в пластиковых пробирках типа “фалькон” с неплотно закрученными крышками, при $24 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 10–14 сут в темноте. Полученный мицелий отделяли центрифугированием, промывали 96%-м этанолом, повторно центрифугировали и переносили в размоленные пробирки. Дезинтеграцию мицелия проводили в размоленных пробирках объемом 2 мл, содержащих стеклянные шарики диаметром 0.4–0.5 мм и 0.5 мл р-ра для лизиса (Проба-ЦТАБ). Пробирки встряхивали в течение 2 мин на вортексе “Vortex genie 2”, используя горизонтальную подставку “MN Bead Tube Holder”, затем проводили лизис в течение 30 мин при 65°C в термошейкере. Далее экстрагировали ДНК в соответствии с инструкцией к набору реагентов. Концентрацию и чистоту ДНК в экстрактах оценивали на спектрофотометре BioSpectrometer®basic (Eppendorf) и путем ПЦР анализа с универсальными праймерами ITS1 F и ITS4 R критерием пригодности был положительный результат ПЦР (табл. 2). Дополнительную очистку экстрактов ДНК при необходимости проводили с использованием автоматической станции “KingFisher Duo Prime” (Thermo Fisher Scientific) и набора реагентов “РеалБест УниМаг” (АО “Вектор Бест”) в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

Амплификация ДНК. ПЦР проводили в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с интеркалирующим красителем SYBR Green на амплификаторе “LightCycler® 96” (Roche). Общий объем реакционной смеси 25 мкл включал: 5 мкл готовой смеси для ПЦР “qPCRmix-HS SYBR” (ЗАО “Евроген”), по 1.0 мкл прямого и обратного праймера с концентрацией 5 или 10 ПкМоль/мкл (табл. 2), 17 мкл воды без нуклеаз и 1 мкл экстракта ДНК. Программа амплификации: первичная денатурация – 10 мин при 95°C , амплификация – 40 циклов при 95°C (20 с) (температура отжига – см. табл. 2) и анализ кривых плавления. Флуоресценция реги-

Таблица 1. Происхождение, выделенных из зеленого кофе штаммов *Aspergillus* spp.

№ штаммов	Регион происхождения кофе
22/2, 22/3, 23/2, 24/2, 29/1, 29/2, 34/1, 34/2	Бразилия (n = 5)
38/1, 38/3	Вьетнам (n = 1)
30/1, 30/2, 30/4	Гватемала (n = 1)
32/1, 32/3	Гондурас (n = 1)
33/1, 33/2, 36/1, 36/2	Индия (n = 2)
27/2, 35/1, 35/2, 35/4	Колумбия (n = 3)
25/2, 25/3	Куба (n = 1)
37/1, 37/2, 37/3	Танзания (n = 1)
28/1, 28/2, 28/3	Уганда (n = 1)
31/1, 31/2, 31/3	Эфиопия (n = 1)

Примечание. Число образцов обозначено буквой n.

стрировалась в каждом цикле амплификации на стадии элонгации (72°C). Результаты оценивали по нарастанию флуоресценции, значения пороговых циклов Cq (quantification cycle) рассчитывались автоматически программным обеспечением “LightCycler® 96” (Version 1.1.0.1320), специфичность реакции оценивали путем анализа кривых плавления. Все реакции проводили в трех повторностях.

Молекулярная идентификация. Видоспецифичные праймеры подбирали для доминирующих представителей микобиоты зеленого кофе – секций *Nigri*, *Flavi* и других видов продуцентов МТ и ЭМТ. На основе анализа научной литературы были отобраны 20 пар родо- и видоспецифичных праймеров, комплементарных нуклеотидным последовательностям различных участков генома данных грибов (*CaM*, β -*tub*, *18SrDNA*, ITS, *cyp51A*) (табл. 2). Оценку заявленной специфичности праймеров проводили с использованием сервиса “Primer-BLAST” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). При проверке подсчитывали количество гомологов в базах данных “nr” и “RefSeq Representative Genome Database”, с ограничением поиска по царству *Fungi* (taxid: 4751). Валидацию видоспецифичных праймеров проводили со штаммами, полученными из отечественных коллекций микроорганизмов: ВКМ – *A. niger* F-3883, *A. flavus* F-25, *A. ochraceus* F-1265 и ВКПМ – *A. carbonarius* F-40, *A. parasiticus* F-1267.

Исследование токсинообразования в условиях *in vitro*. Проведено по разработанной ранее авторами методике (Minaeva et al., 2021). В качестве субстрата использовали два вида модельных питательных сред: КСА и рисовую (рис шлифованный/вода – 1.3/0.7). Стерильную КСА разливали по 2 мл в стерильные пластиковые пробирки типа “фалькон” (15 мл) с закручивающимися крышка-

Таблица 2. Праймеры, использованные при видовой идентификации изолятов *Aspergillus* и параметры амплификации

Специфичность	Целевой локус	Праймеры	Последовательность (5'–3')	t отжига, °C	N праймера, пкмоль/мкл	Авторы
Универсальные праймеры к грибной рРНК	ITS	ITS1 F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	58	5	White et al. (1990)
		ITS4 R	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
<i>A. niger</i>	CaM	An F	GGATTTCGACAGCATTTTCC AGAACG	66	5	Palumbo et al. (2015)
		An R	GATAAAACCATTGTTGTCGC GGTCG			
<i>A. carbonarius</i>	“ ”	Ac F	AGCCGTTTTCCAAGCGACTT GAGC	66	5	“ ”
		Ac R	CCTCGTGTGAACACAAGCCC GC			
<i>A. welwitschiae</i>	“ ”	Aw F	GGGATTTCGACAGCATTTCT CAGAATT	66	5	“ ”
		Aw R	GATAAAACCATTGTTGTCGC GGTCA			
<i>A. tubingensis</i>	“ ”	At F	GGATTTCGACAGCTATTTCC CCCTT	66	5	“ ”
		At R	GCGGCAAAAGTCAATCACAA TCCATA			
<i>A. flavus</i>	ITS2 rDNA	FVAVIQ1	GTCGTCCCCTCTCCGG	58	10	Sardiñas et al. (2011)
		FLAQ2	CTGGAAAAAGATTGATTGCG			
<i>A. parasiticus</i>	“ ”	FVAVIQ1	GTCGTCCCCTCTCCGG	58	10	“ ”
		PARQ2	GAAAAAATGGTTGTTTTGCG			
<i>A. ochraceus</i>	ITS1–5.8 S–ITS2	OCRAF	CTTTTCTTTTAGGGGGGCAC AG	57	10	El Sheikha (2019)
		OCRAR	CAACCTGGAAAAATAGTTGG TTG			
<i>A. fumigatus</i>	β -tub	Fum1 F	TGACGGGTGATTGGGATCTC	59	10	Serrano et al. (2011)
		Fum1 R	CGTCCGCTTCTTCCTTGTTT			
<i>A. nomius</i>	ITS	Anits-F	ACACCACGAACCTCTGAAC	65	10	Godet et al. (2010)
		Anits-R	CGAGGTCAACCTGGAAAGAA TGTTGTTT			

Примечание. N – концентрация, t – температура.

ми и раскладывали в скошенном положении для застывания; рисовую среду вносили непосредственно в пробирки по 2 г в каждую, стерилизовали с плотно закрученными крышками при 121°C 15 мин дважды через день. Подготовленные пробирки со средами инокулировали по 0.1 мл споровой суспензией, полученной смывом с предварительно выращенных на КСА исследуемых культур. Посев проводили в трех повторностях на каждую среду, крышки пробирок закручивали неплотно для создания аэробных условий роста грибных культур. В качестве отрицательного контроля для каждого вида среды вместо инокулята вносили стерильный физраствор. Посевы инкубировали при 25 ± 1°C в течение 14 сут.

Экстракция микотоксинов. Проведена непосредственно из субстратного мицелия. В пробирки с посевами вносили по 5 мл экстрагента (ацетонитрил/вода/уксусная кислота – 80/20/0.5% об.), крышки плотно закручивали и интенсивно перемешивали на вортексе не менее 1 мин, выдерживали 1 ч в ультразвуковой бане с периодическим перемешиванием, после чего 1 ч интенсивно встряхивали на шейкере. Далее центрифугировали при 4000 g в течение 10 мин и отбирали по 1 мл супернатанта А, из трех параллельных посевов делали объединенную пробу. К супернатанту А добавляли деионизированную воду (miliQ) в соотношении 1 : 1, повторно центрифугировали на мини-центрифуге при 12100 g 10 мин. Супернатант Б,

объемом 1.5 мл помещали в хроматографическую виалу для анализа ВЭЖХ-МС/МС.

Анализ микотоксинов. Афлатоксины АФЛ (В1, В2, G1 и G2), охратоксин А (ОТА), стеригматоцистин (СТЦ), фумонизины В1 и В2 (ФБ1 и ФБ2), микофеноловую кислоту (МФК), пеницилловую кислоту (ПК) определяли методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме мультidetекции по разработанной ранее методике (Sedova et al., 2022). Для исключения влияния матрикса и получения ложноположительных результатов, стандарты МТ разводили в экстрактах соответствующих питательных сред. Стандартное отклонение для трех повторностей анализа микотоксинов в экстрактах из субстратного мицелия, составляло 7.4% (получено с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Фенотипическая идентификация

Из внутренней микофлоры 16 образцов зерен зеленого кофе были выделены 34 МСИ различных видов грибов рода *Aspergillus*, преобладавших в посевах.

Морфологические характеристики изучаемых изолятов сопоставляли со штаммами, полученными из российских коллекций микроорганизмов ВКМ¹: *A. niger* ВКМ F-3883, *A. flavus* ВКМ F-25, *A. ochraceus* ВКМ F-43 и ВКПМ²: *A. carbonarius* ВКПМ F-40 и *A. ochraceus* ВКПМ F-1265. По результатам фенотипической идентификации среди 34 исследованных МСИ наибольшую группу — 20 изолятов (59%) — составили виды секции *Nigri*, в меньшем количестве выявлены изоляты из секции *Flavi* — восемь (23.5%), секции *Circumdati* — пять (14.7%) и секции *Fumigati* — один (табл. 3).

В группе секции *Nigri* 19 морфологически схожих МСИ проявили типичные признаки: формирование колоний со светлым мицелием и конидиями от темно-коричневого до черного цвета; активный рост в диапазоне от 24 до 40°C и низкий при 15°C; высокий уровень кислотообразования; формирование шаровидных конидий 3–5 мкм в диам. на двухрядных конидиальных головках. Только один штамм (28/3) отличался активным ростом в широком диапазоне от 15 до 40°C, значительно сниженным кислотообразованием и крупными конидиями 7–9 мкм в диам. с характерной колючей поверхностью. Такие признаки внутри видов секции *Nigri* характерны для *A. carbonarius* (Samson et al., 2007; Pitt et al., 2009), что позволило идентифицировать видовую принадлежность штамма (28/3) по культурально-морфологическим признакам.

¹ ВКМ — Всероссийская коллекция микроорганизмов.

² ВКПМ — Национальный биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов НИЦ “Курчатовский институт”.

В группу *Aspergillus* секции *Flavi* было выделено восемь морфологически схожих изолятов, растущих активно при 24 и 36°C, умеренно при 40°C и слабо при 15°C, кислотообразование отсутствовало. В окраске всех колоний доминировали цвета различной насыщенности (желто-зеленый, оливковый зеленый), шаровидные конидии 3–6 мкм в диам. с небольшими шипами формировались на однорядных и двурядных конидиальных головках.

В группу секции *Circumdati* было выделено пять изолятов, формирующих колонии с характерной окраской от светлого желто-бежевого цвета в центре колонии до белого на периферии с обильными конидиями от белого до светло-желтого цвета. Два изолята (30/4 и 33/2) проявляли активный рост при 24°C, умеренный при 36°C и отсутствие роста при 40°C. Другие три изолята (27/2, 35/1 и 37/3) отличались отсутствием роста при 36 и 40°C, формированием складчатых колоний с ярко-розовыми склероциями и образованием пигмента на среде СУА при 33°C. У всех пяти штаммов шаровидные мелко шероховатые конидии 3–5 мкм в диам. образовывались на двурядных конидиальных головках. Образование склероциев ярко-розового цвета внутри видов секции *Circumdati* характерно для *A. westerdijkiae*, а наличие желтовато-оранжевого пигмента при 33°C является признаком, отличающим *A. westerdijkiae* от *A. ochraceus* (Visagie et al., 2014).

Один изолят (24/2) образовывал колонии серо-голубого цвета, активно растущие при 36°C и 40°C, при 24°C рост был умеренный, а при 15°C — слабый. Отличительной особенностью от описанных выше видов было формирование шаровидных конидий 2–4 мкм в диам. на однорядных столбчатых конидиальных головках с характерным однонаправленным ростом фиалид. По совокупности морфологических признаков этот штамм был отнесен к секции *Fumigati* (Pitt et al., 2009).

Молекулярно-генетические исследования

Изоляты, отнесенные к секции *Nigri* по фенотипическим признакам, тестировали с праймерами, специфичными к видам *A. niger* (An), *A. carbonarius* (Ac), *A. tubingensis* (At) и *A. welwitschiae* (Aw); изоляты, отнесенные к секции *Flavi* — с праймерами, специфичными к *A. flavus* (FVAVIQ1/FLAQ2), *A. parasiticus* (FVAVIQ1/PARQ2) и *A. nomius* (Anits-F/Anits-R); изоляты, отнесенные к секции *Circumdati* — с праймерами, специфичными к *A. ochraceus* (OCRAF/OCRAR), изолят, отнесенный к секции *Fumigati* — с праймерами, специфичными к *A. fumigatus* (Fum1 F/Fum1 R) (табл. 4).

По результатам ПРЦ с видоспецифичными праймерами была подтверждена или уточнена фенотипически установленная видовая дифференциация. Среди изолятов морфотипа секции *Nigri* 18 штаммов идентифицированы как *A. niger*, по

Таблица 3. Морфологические характеристики исследуемых изолятов *Aspergillus* spp.

№ штамма	Размер колоний на СУА при 15, 24, 36 и 40°C	Цвет колоний и окраска реверса на среде СУА при 24°C	Кислотообразование на среде CREA	Диаметр и форма конидий	Видовая принадлежность
22/3, 23/2, 25/2, 28/1, 29/1, 29/2, 30/1, 31/1, 31/3, 32/1, 34/1, 36/1, 37/1, 37/2, 22/2, 28/2, 33/1, 35/4, 38/1	15°C: 11–14 мм; (24, 36 и 40)°C: 60–86 мм	От белого до светло-коричневого цвета с конидиями от темно-коричневого до черного. Реверс от белого до желтого разной насыщенности	обнаружено	3–5 мкм, шаровидные, от гладких до мелко морщинистых на двурядных конидиальных головках	<i>Aspergillus</i> секции <i>Nigri</i>
28/3	15°C: 50–55 мм; 24°C: 60–63 мм; 36°C: 60–63 мм; 40°C: 40–44 мм	От белого до светло-коричневого цвета с конидиями от темно-коричневого до черного. Реверс желтого цвета разной насыщенности	слабое	7–9 мкм, шаровидные с шипами на двурядных конидиальных головках	<i>Aspergillus</i> секции <i>Nigri</i> (<i>A. carbonarius</i>)
30/2, 34/2, 35/2, 38/3, 25/3, 31/2, 32/3, 36/2	15°C: 9–20 мм; 24°C: 34–55 мм; 36°C: 30–60 мм; 40°C: 28–30 мм	Оливково-желтый мицелий с желто-зелеными конидиальными головками. Реверс не окрашен	не обнаружено	3–6 мкм, шаровидные гладкие и шероховатые на однорядных и двурядных конидиальных головках. Везикулы 30–45 мкм. Склероции белые в глубине мицелия	<i>Aspergillus</i> секции <i>Flavi</i> (<i>A. flavus</i>)
30/4, 33/2	15°C: 18–19 мм; 24°C: 55–61 мм; 36°C: 34–36 мм; 40°C: роста нет	От светлого желто-бежевого цвета в центре колонии до белого на периферии с конидиями от белого до светло-желтого цвета, прозрачный экссудат центральной части колонии. Реверс кремово-желтого цвета	не обнаружено	3–4 мкм, шаровидные с шероховатой поверхностью на двурядных конидиальных головках. Склероции желто-коричневые	<i>Aspergillus</i> секции <i>Circum-dati</i> (<i>A. ochraceus</i>)
27/2, 35/1, 37/3	15°C: 25–28 мм; 24°C: 45–53 мм; 36–40°C: роста нет	От светлого желто-бежевого цвета в центре колонии до белого на периферии с конидиями от бледно-желтого до светло-желтого цвета, прозрачный экссудат в центральной части колонии. Реверс от светлого желтого до желто-оранжевого. Образование пигмента при 33°C	не обнаружено	3–5 мкм, шаровидные шероховатые на двурядных конидиальных головках. Склероции ярко розовые	<i>Aspergillus</i> секции <i>Circum-dati</i> (<i>A. westerdijkiae</i>)
24/2	15°C: 10–12 мм; 24°C: 30–55 мм; 36°C: 60–80 мм; 40°C: 75–86 мм	Серовато-голубой. Реверс кремовый	не обнаружено	2–4 мкм, шаровидные мелко-шероховатые на однорядных столбчатых конидиальных головках, везикулы колбовидной формы 12–25 мкм	<i>Aspergillus</i> секции <i>Fumigati</i> (<i>A. fumigatus</i>)

Таблица 4. Видовая принадлежность изолятов *Aspergillus* sp. по результатам анализа ПЦР-РВ

№ штамма	По фенотипу	Методом ПЦР-РВ	Результаты ПЦР анализа с видоспецифическими праймерами								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
Оригинальные штаммы											
22/2, 23/2, 25/2, 28/1, 28/2, 29/1, 29/2, 30/1, 31/1, 31/3, 32/1, 33/1, 34/1, 35/4, 36/1, 37/1, 37/2, 38/1	<i>Aspergillus</i> секции <i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	+	—	—	—					
22/3	<i>Aspergillus</i> секции <i>Nigri</i>	<i>A. tubingensis</i>	—	—	+	—					
28/3	<i>Aspergillus</i> сек- ции <i>Nigri</i> (<i>A.</i> <i>carbonarius</i>)	<i>A. carbonarius</i>	—	+	—	—					
25/3, 30/2, 31/2, 32/3, 34/2, 35/2, 36/2, 38/3	<i>Aspergillus</i> секции <i>Flavi</i> (<i>A. flavus</i>)	<i>A. flavus</i>					+	—			—
30/4, 33/2	<i>Aspergillus</i> сек- ции <i>Circum-</i> <i>dati</i> (<i>A.ochraceus</i>)	<i>A. ochraceus</i>							+		
27/2, 35/1, 37/3	<i>Aspergillus</i> сек- ции <i>Circum-</i> <i>dati</i> (<i>A.westerdi-</i> <i>jkiae</i>)								—		
24/2	<i>Aspergillus</i> сек- ции <i>Fumigati</i> (<i>A. fumigatus</i>)	<i>A. fumigatus</i>								+	
Штаммы из российских коллекций											
<i>A. niger</i> ВКМ F-3883		<i>A. niger</i>	+	—	—	—					
<i>A. carbonarius</i> ВКПМ F- 40		<i>A. carbonarius</i>	—	+	—	—					
<i>A. flavus</i> ВКМ F-25		<i>A. flavus</i>					+	—			
<i>A. parasiticus</i> ВКПМ F-1267		<i>A. parasiticus</i>					—	+			
<i>A. ochraceus</i> ВКПМ F-1265		<i>A. ochraceus</i>							+		

Примечание. Положительный результат ПЦР обозначен как “+”, отрицательный — как “—”. Пустая ячейка таблицы означает отсутствие данных (ПЦР с указанными праймерами не проводили). Видоспецифические праймеры: 1 — *Aspergillus niger*; 2 — *A. carbonarius*; 3 — *A. tubingensis*; 4 — *A. welwitschiae*; 5 — *A. flavus*; 6 — *A. parasiticus*; 7 — *A. ochraceus*; 8 — *A. fumigatus*; 9 — *A. nomius*.

одному — как *A. tubingensis* и *A. carbonarius* (табл. 4); все восемь изолятов морфотипа секции *Flavi* определены как *A. flavus*; из пяти изолятов секции *Circumdati* два штамма дали положительный результат с праймерами *A. ochraceus*, а для трех других положительной ПЦР не было отмечено; штамм из секции *Fumigati* был идентифицирован как *A. fumigatus*.

Анализ продукции токсичных метаболитов. Сравнительные исследования токсиногенных свойств 34 изолятов на рисовой среде и КСА в условиях *in vitro* показали выявление на рисовой среде большего числа видов МТ и наибольшие уровни их синтеза для всех исследованных видов МТ (табл. 5). Из 20 штаммов *A. niger* у 12 была выявлена продукция ФБ2, при этом уровень синтеза

Таблица 5. Видовая принадлежность изолятов *Aspergillus* spp. по результатам полифазного анализа

№ штамма	Видовая принадлежность на основе		Микотоксины, продуцируемые в условиях <i>in vitro</i> : мг/кг субстрата	Видовая принадлежность на основе полифазного подхода
	морфологии	молекулярного анализа		
23/2, 25/2, 28/1, 29/1, 29/2, 30/1, 31/1, 31/3, 32/1, 34/1, 36/1, 37/1, 37/2	<i>Aspergillus</i> секции <i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	ФВ2: 0.017–24.1	<i>A. niger</i>
22/2, 28/2, 33/1, 35/4, 38/1		<i>A. niger</i>	ОТА: 0.9	<i>A. niger</i>
22/3		<i>A. niger</i>	н/о	<i>A. niger</i>
22/3		<i>A. tubingensis</i>	н/о	<i>A. tubingensis</i>
28/3	<i>Aspergillus</i> секции <i>Nigri</i> – <i>A. carbonarius</i>	<i>A. carbonarius</i>	н/о	<i>A. carbonarius</i>
30/2, 34/2, 35/2, 38/3	<i>Aspergillus</i> секции <i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	АФЛ В1: 11.9–27.9; АФЛ В2: 0.15–1.44; СТП: 0.01–0.66	<i>A. flavus</i>
25/3, 31/2, 32/3, 36/2,		<i>A. flavus</i>	н/о	<i>A. flavus</i>
30/4, 33/2	<i>Aspergillus</i> секции <i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	ПК: 0.07–0.15	<i>A. ochraceus</i>
27/2, 35/1, 37/3		вид не установлен	ОТА: 6.0; 145.4 и 518.0; ПК: 0.81; 0.95 и 0.57	<i>A. westerdijkiae</i>
24/2	<i>Aspergillus</i> секции <i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	н/о	<i>A. fumigatus</i>

Примечание: “н/о” – не обнаружено.

на рисовой среде в 1.1–130 раз превышал таковой на среде КСА, из них у трех изолятов продукция ФВ2 на КСА отсутствовала вовсе. Один штамм *A. niger* (37/2) продуцировал ОТА в небольших количествах на обоих видах субстратов, остальные пять штаммов *A. niger* и штаммы *A. tubingensis* и *A. carbonarius* были не токсиногенными.

Среди восьми штаммов *A. flavus* только четыре (30/2, 34/2, 35/2 и 38/3) были токсиногенными и синтезировали на рисовой среде одновременно афлатоксины (В1 и В2) и СТП, причем на КСА продукция АФЛ В2 не была выявлена ни у одного штамма, а продукция АФЛ В1 обнаруживалась только у двух штаммов, но в значительно меньших количествах, уровни которых были ниже в 8 и 1100 раз. Штаммы 25/3, 31/2, 32/3, 36/2 токсины не продуцировали.

Из пяти штаммов секции *Circumdati* три (27/2, 35/1, 37/3) накапливали на рисовой среде ОТА на очень высоких уровнях – 6.0, 145.4 и 518.0 мг/кг субстрата, соответственно (что превышало таковой на КСА от 2.5 до 830 раз), а также ПК в количествах от 0.57 до 0.95 мг/кг субстрата. Два штамма *A. ochraceus* (30/4 и 33/2) производили только ПК на рисовой среде – 0.15 и 0.07 мг/кг субстрата, соответственно. Штамм *A. fumigatus* не продуцировал ни один из исследованных МТ.

Обобщенные результаты исследования 34 штаммов, полученные при культурально-морфологическом, молекулярно-генетическом и хемотаксономическом анализе, представлены в табл. 5. Видовая принадлежность 31 штамма подтверждена молекулярно-генетическим методом, а для трех указана видовая принадлежность с учетом совокупности полученных характеристик.

ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексный подход при изучении видового состава микромицетов зерен зеленого кофе позволил получить наиболее полную характеристику выделенных изолятов. Род *Aspergillus* включает разнообразные группы видов, дифференциация которых, ранее основанная на фенотипических признаках, в последние десятилетия сильно расширилась с учетом молекулярных и хемотаксономических характеристик. Для описания видов и выявления фенотипических отличий ранее были предложены наиболее информативные диагностические инструменты, включающие описание макроскопических (темпы роста колоний при разных температурах, текстуру, степень споруляции, продукцию склероциев, цвет мицелия и реверса, пигментацию, эксудацию и др.) и микроскопических характеристик (форма конидиальных голо-

вок, их расположение, размер и форма везикул, метул, фиалид, конидий, особенности скульптуры поверхности конидий, и др.) (Samson et al., 2014). Как известно, *Aspergillus* sect. *Nigri* считается одной из наиболее сложных групп в отношении классификации и фенотипической идентификации ввиду схожести морфологических характеристик (Samson et al., 2007).

Применение вышеуказанных диагностических методик позволило четко выделить 20 штаммов в группу секции *Nigri*, отличающуюся от других групп наличием кислотообразования, а внутри группы выявить *A. carbonarius* (28/3), видовая принадлежность которого была подтверждена с видоспецифичными праймерами. Для остальных морфологически близких изолятов видовая дифференциация была проведена в результате анализа ПЦР: 18 штаммов идентифицированы как *A. niger*, один *A. tubingensis* (22/3). Среди штаммов *A. niger* 12 продуцировали ФВ2 и один ОТА, остальные пять штаммов *A. niger*, а также *A. carbonarius* и *A. tubingensis* были нетоксиногенными. Образование ФВ2 штаммами *A. niger* в условиях *in vitro* варьировало от низких значений (0.017 мг/кг субстрата) до высоких — 24.1 мг/кг (табл. 5), достигая уровней, сопоставимых с продукцией этого МТ типичным продуцентом — *Fusarium verticillioides*. Стоит отметить, что продуцент ОТА штамм 37/2 был выделен из образца кофе, выращенного в Танзании, а продуценты ФВ2 были выделены из образцов кофе различного географического происхождения (Бразилия, Куба, Гватемала, Гондурас, Уганда, Эфиопия, Танзания и Индия) (табл. 1 и 5), что свидетельствует о широком распространении фумонизинпродуцирующих видов *A. niger*. Способность *A. niger*, выделенных из зерен зеленого кофе, синтезировать ОТА, была описана в 2004 г. (Samson et al., 2004), а ФВ2 — в 2008 г. (Noonim, 2008). Также в секции *Nigri* были описаны другие ОТА-продуцирующие виды, изолированные из кофе (*A. lacticoffeatus*, *A. sclerotioniger* и *A. carbonarius*), последний часто выделяется также из винограда и изюма (Samson et al., 2004).

В следующей группе секции *Flavi* все восемь изолятов идентифицированы с видоспецифичными праймерами как *A. flavus*. У половины штаммов *A. flavus* обнаружена способность к синтезу одновременно нескольких МТ: АФЛ (В1 и В2) и СТЦ (табл. 5). Как известно, СТЦ является биогенным предшественником АФЛ В1, при этом не все продуценты афлатоксинов способны к совместному их накоплению. Такая способность в секции *Flavi* описана для видов *A. nidulans*, *A. motae* и *A. togoensis* (Frisvad et al., 2019). В генетической регуляции кластеров генов афлатоксина и стеригматоцистина положительную роль играет регуляторный ген *aflR*, однако нарушение регуляции может тормозить превращение СТЦ в АФЛ и приводить к накоплению последнего (Yu et al.,

2011). Штаммы *A. flavus*, способные к накоплению высоких уровней АФЛ В1, были выделены из образцов, полученных из Гватемалы, Бразилии, Колумбии и Вьетнама.

К группе секции *Circumdati* фенотипически были отнесены пять изолятов, из которых три (27/2, 35/1, 37/3) имели морфологические признаки характерные для *A. westerdijkiae*, у двух других изолятов (30/4 и 33/2) результатами ПЦР анализа была подтверждена принадлежность к виду *A. ochraceus* (табл. 4). Все штаммы продуцировали ПК, при этом синтез опасного ОТА был выявлен только у трех штаммов (27/2, 35/1, 37/3), причем на очень высоких уровнях — до 518 мг/кг. По опубликованным данным, в секции *Circumdati* наиболее важными видами, с точки зрения потенциального образования ОТА в кофе, являются *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* и *A. steynii* (Frisvad et al., 2004), причем для *A. ochraceus* характерно нестабильное производство ОТА как в малых, так и в больших количествах, в то время как для *A. westerdijkiae* отмечены стабильно высокие уровни синтеза ОТА и высокая частота обнаружения в кофейных зернах (Noonim et al., 2008). При исследовании источников ОТА в бразильском кофе *A. westerdijkiae* был признан основным видом, продуцирующим ОТА (Taniwaki et al., 2019). Синтез ПК ранее был отмечен у большинства видов секции *Circumdati* (24 из 27), включая *A. ochraceus* и *A. westerdijkiae*, но при этом отсутствовал у *A. steynii* (Visagie et al., 2014). Морфологически *A. westerdijkiae* отличается от *A. steynii* розовым цветом склероциев, тогда как *A. steynii* формирует желтовато-зеленые склероции, а от *A. ochraceus* отличается отсутствием роста при 36°C и стабильной продукцией желтовато-оранжевого пигмента на среде СYA при 33°C (Visagie et al., 2014). С учетом фенотипических характеристик и высоких уровней продукции ОТА и ПК, три штамма (27/2, 35/1 и 37/3) были отнесены к *A. westerdijkiae*. Регионы происхождения образцов показывают широкую географическую распространенность видов секции *Circumdati* — *A. ochraceus* выделен из образцов, произведенных в Гватемале и Индии, а изоляты *A. westerdijkiae* — суперпродуценты ОТА из образцов, полученных из Колумбии и Танзании.

Секция *Fumigati* была представлена одним изолятом *A. fumigatus*, выделенным из бразильского кофе, видовая принадлежность которого была определена при ПЦР с видоспецифичными праймерами. Основной средой обитания *A. fumigatus* является разлагающаяся растительность, этот вид часто обнаруживают в тропических регионах в продуктах, в которых при хранении происходит процесс самопроизвольного нагревания, например, на стадиях ферментации и сушки кофе. Способность расти одновременно при низкой активности воды и высоких температурах обеспечивает этому виду экологическое преимущество. Сооб-

шалось, что *A. fumigatus* являлся одной из причин посторонних привкусов кофе “Рио” (Liardon et al., 1992), но при этом не являлся причиной серьезной порчи (Pitt et al., 2009). У выделенного в данном исследовании штамма (24/2) продукция МТ не была выявлена (табл. 5).

Показано, что наиболее полно потенциальные токсинопродуцирующие способности *Aspergillus* spp. выявляются на среде с рисом. Высокие уровни ФВ2 до 54 мг/кг и ОТА до 0.43 мг/кг, синтезируемые на рисовой среде и превышающие таковые на других видах питательных субстратов (СУА, РДА), были показаны также в исследованиях, проводимых на штаммах *A. niger* — промышленных продуцентах, используемых в пищевой промышленности (Han et al., 2017, 2019).

Полифазный подход позволяет получать надежные данные о видовом составе, расширенную характеристику профиля токсичных метаболитов и наиболее полную характеристику новых штаммов микромицетов. Полученные авторами результаты видового состава грибов рода *Aspergillus* с доминированием *A. niger* на фоне присутствия *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. fumigatus* в зернах зеленого кофе согласуются с результатами других исследователей, которые также отмечали похожий состав *Aspergillus* spp. с преобладанием *A. niger* (Perrone et al., 2007; Frisvad et al., 2004; Pitt et al., 2009). Анализ вторичных метаболитов, накопленных в условиях *in vitro*, показал у выделенных штаммов высокий потенциала токсинообразования. Так, 20 из 34 штаммов продуцировали в значительных количествах как опасные, регламентируемые МТ: АФЛ В1, ОТА, ФВ2, так и эмерджентный МТ — СТЦ. Это подтверждает наличие высокого риска загрязнения кофе МТ на стадиях ферментации, сушки и других, предшествующих стадии обжарки, в случаях нарушения технологических режимов. Наличие высокотоксичных штаммов рода *Aspergillus* вызывает особую настороженность, в связи с тем, что отдельные виды *Aspergillus*, преимущественно *A. niger*, наиболее широко используются в качестве промышленных продуцентов различных пищевых ферментов, органических кислот и других продуктов микробного синтеза (Frisvad et al., 2011; Han et al., 2017, 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено изучение видового состава микромицетов рода *Aspergillus* выделенных из внутренней микофлоры 16 образцов зерен зеленого кофе сортов арабика и робуста, выращенных в регионах Африки, Юго-Восточной Азии, Центральной и Южной Америки, полученных из розничной сети Московского региона. С применением полифазного подхода культурально-морфологическими методами определены фенотипы 34 изолятов

Aspergillus spp., молекулярно-генетическим анализом уточнена их видовая принадлежность, в условиях *in vitro* изучен профиль продуцируемых токсических метаболитов. Установлено доминирование в микофлоре кофе токсиногенных видов *A. niger*, большинство из которых продуцировали ФВ 2, а один опасный ОТА. В группе *Aspergillus* секции *Flavi* половина штаммов *A. flavus* продуцировала одновременно АФЛ (В1 и В2) и СТЦ (ЭМТ). В секции *Circumdati* все изоляты *A. ochraceus* и *A. westerdijkiae* синтезировали ПК и только *A. westerdijkiae* — ОТА. Количественные уровни продуцируемых МТ демонстрируют высокий токсиногенный потенциал *Aspergillus* spp. — контаминантов зеленого кофе. Нетоксиногенные изоляты были представлены видами *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. flavus* и *A. fumigatus*. Изучение видового состава и токсиногенных свойств грибов рода *Aspergillus* — контаминантов зеленого кофе проведено в России впервые.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда “Эмерджентные микотоксины в пищевых продуктах растительного происхождения: разработка методов анализа, изучение контаминации, видовая характеристика микромицетов-продуцентов, разработка гигиенических нормативов” (проект № 18-16-00077-П).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Al-Shuhaib M.B.S., Albakri A.H., Alwan S.H. et al. Optimal pcr primers for rapid and accurate detection of *Aspergillus flavus* isolates. Microb Pathog. 2018. V. 116. P. 351–335. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.049>
- Commission Regulation (EC) No 1831/2006. Commission Directive 2006/1831/EC of 19 December 2006, setting maximum levels for certain contaminants in food stuffs. Off. J. Eur. Commun. 2006. L364. P. 5–24.
- El Sheikh A.F. Molecular detection of mycotoxigenic fungi in foods: The case for using PCR-DGGE. Food Biotechnol. 2019. V. 33 (1). P. 54–108. <https://doi.org/10.1080/08905436.2018.1547644>
- Frisvad J.C., Frank J.M., Houben J.A.M.P. et al. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. Stud. Mycol. 2004. 50. P. 23–43.
- 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>
- Frisvad J.C., Larsen T.O., Thrane U. et al. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. PLOS One. 2011. V. 6 (8). P. e23496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023496>
- Gagkaeva T.Yu., Gavrilova O.P., Levitin M.M. et al. *Fusarium* head blight. Zashchita i karantin rasteniy. Supplement. 2011. N 5. P. 69–120 (in Russ.).
- Godet M., Munaut F. Molecular strategy for identification in section *Flavi*. FEMS Microbiol. Letters. 2010. V. 304 (2). P. 157–168. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01890.x>

- González-Salgado A., González-Jaén T., Vázquez C. et al. Highly sensitive PCR-based detection method specific for *Aspergillus flavus* in wheat flour. Food Additives and Contaminants. 2008. V. 25 (6). P. 758–764. <https://doi.org/10.1080/02652030701765715>
- Grube M., Gaya E., Kauserud H. et al. The next generation fungal diversity researcher. Fungal Biology Reviews. 2017. 31. P. 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.02.001>
- Han X., Jiang H., Xu J. et al. Dynamic fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* intended used in food industry in China. Toxins. 2017. V. 9 (7). P. 217. <https://doi.org/10.3390/toxins9070217>
- Han X., Jiang H., Li F. Dynamic ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* intended used in food industry of China. Toxins. 2019. V. 11 (2). P. 122. <https://doi.org/10.3390/toxins11020122>
- Inderbitzin P., Robbertse B., Schoch C.L. Species identification in plant-associated prokaryotes and fungi using DNA. Phytobiomes Journal. 2020. V. 4. P. 103–114. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-12-19-0067-RVW>
- Ipatova A.A. Overview of the Russian coffee market in 2017–2019. Russian food market. 2020. № 1 (in Russ.).
- Jens C., Frisvad J., Frank M. et al. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. Stud. Mycol. 2004. V. 50. P. 23–43.
- Jurjevic Z., Peterson S.W., Horn B.W. *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. IMA Fungus. 2012. V. 3 (1). P. 59–79. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2012.03.01.07>
- Liardon R., Braendlin N., Spadone J.C. Biogenesis of Rio flavour impact compound: 2,4,6-trichloroanisole. In: Proc. 14th Int. Conf. Coffee Sci., San Francisco, 14–19 July 1991. Paris, Assoc. Sci. Int. Café, 1992, pp. 608–614.
- Minaeva L.P., Polyana A.S., Kiseleva M.G. et al. Dried fruits marketed in Russian: toxigenic mold contamination. Gigiena i sanitariya. 2021. V. 100 (7). P. 717–723 (in Russ.). <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-7-717-723>
- Noonim P., Mahakarnchanakul W., Nielsen K.F. et al. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. Int. J. Food Microbiol. 2008. V. 128 (2). P. 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.005>
- Palumbo J.D., O’Keeffe T.L. Detection and discrimination of four *Aspergillus* section *Nigri* species by PCR. Letters Appl. Microbiol. 2015. V. 60. (2). P. 188–195. <https://doi.org/10.1111/lam.12358>
- Perrone G., Susca A., Cozzi G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. Stud. Mycol. 2007. 59. P. 53–66. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.07>
- Pitt J.I., Hocking A.D. Fungi and food spoilage. 3rd Edition, Springer Dordrecht, Heidelberg, etc., 2009. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Samson R.A., Houbraken A.M.P., Kuijpers A.F.A. et al. New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. Stud. Mycol. 2004. V. 50 (1). P. 45–61.
- Samson R.A., Noonim P., Meijer M. et al. Diagnostic tools to identify black aspergilli. Stud. Mycol. 2007. V. 59. P. 129–145. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.13>
- Samson R.A., Visagie C.M., Houbraken J. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Stud. Mycol. 2014. V. 78. P. 141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Sardiñas N., Vázquez C., Gil-Serna J. et al. Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR® Green quantitative PCR. Int. J. Food Microbiol. 2011. V. 145 (1). P. 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.041>
- Sedova I.B., Chalyy Z.A., Efimochkina N.R. et al. Mycotoxin contamination of fresh berries and fruits marketed in the central region of Russia. Health Risk Analysis. 2022. V. 4. P. 87–99. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2022.4.08.eng>
- Serrano R., Gusmão, L., Amorim A. et al. Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* within the section *Fumigati*. BMC Microbiol. 2011. V. 11. Art. 82. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-82>
- Taniwaki M.H., Pitt J.I., Copetti M.V. et al. Understanding mycotoxin contamination across the food chain in Brazil: Challenges and opportunities. Toxins. 2019. V. 11 (7). P. 411. <https://doi.org/10.3390/toxins11070411>
- Visagie C.M., Varga J., Houbraken J. et al. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). Stud. Mycol. 2014. V. 78. P. 1–61. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.001>
- White T.J., Bruns T., Lee S. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis etc. (eds). PCR protocols: a guide to methods and applications. N.Y., Academic Press Inc., 1990, pp. 315–322.
- Yu Ji., Nierman W.C., Fedorova N.D. et al. What can the *Aspergillus flavus* genome offer to mycotoxin research? Mycology. 2011. V. 2 (3). P. 218–236. <https://doi.org/10.1080/21501203.2011.605180>
- Гагкаяева Т.Ю., Гаврилова О.П., Левитин М.М. и др. (Gagkaeva et al.) Фузариоз зерновых культур // Приложение к журналу “Защита и карантин растений”. 2011. № 5. С. 69–120.
- Ипатова А.А. (Ipatova) Обзор российского рынка кофе в 2017–2019 году // Российский продовольственный рынок. 2020. № 1.
- Минаева Л.П., Полянина А.С., Киселева М.Г. и др. (Minaeva et al.) Изучение контаминации сухофруктов токсигенными плесневыми грибами // Гигиена и санитария. 2021. Т. 100. № 7. С. 717–723.
- Чалый З.А., Киселева М.Г., Седова И.Б. и др. (Chalyy et al.) Изучение контаминации сухофруктов микотоксинами // Вопросы питания. 2021. Т. 90. № 1. С. 33–39.

Identification of Green Coffee Contaminated Microfungi of the Genus *Aspergillus* on the Basis of Polyphasic Approach

L. P. Minaeva^{a,#}, Yu. M. Markova^{a,##}, A. D. Evsyukova^{a,###}, I. B. Sedova^{a,####}, and Z. A. Chalyy^{a,#####}

^aFederal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, 109240 Moscow, Russia

[#]e-mail: liuminaeva-ion@mail.ru

^{##}e-mail: yulia.markova.ion@gmail.com

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

^{####}e-mail: isedova1977@mail.ru

^{#####}e-mail: tokka66@bk.ru

The *Aspergillus* species are widespread in the environment, able to grow at high temperatures and minimal humidity, including in regions with a hot tropical climate. Some species have the potential to produce toxins. This causes the risk of contamination by fungi of the genus *Aspergillus* and the mycotoxins (MT) produced by them of plant materials and food products, which is possible at any stage of production, transportation and storage. In the volume of coffee imported to the Russian Federation, 85% is accounted for by raw materials (green coffee), for which the risks of mold damage remain at all stages preceding the roasting stage. It is relevant to study the species composition and toxinogenic properties of *Aspergillus* spp., which contaminate food raw materials for the production of mass consumption foodstuffs. Contaminated products include coffee, which is one of the basic products of the consumer basket. Reliable data on species identification and toxigenic potential of *Aspergillus* spp. can be obtained only with an integrated approach based on polyphasic taxonomy. The purpose of this work is to study the species composition of fungi of the genus *Aspergillus* isolated from green coffee using an integrated approach based on polyphasic taxonomy. The species composition of fungi of the genus *Aspergillus* from the internal mycoflora of 16 samples of green coffee beans of Arabica and Robusta. The species belonging of the isolated 34 single-spore isolates of *Aspergillus* spp. was determined by cultural and morphological methods and confirmed by molecular genetic analysis, i.e., RT-PCR with DNA markers of conservative sequences (*ITS*, *CaM*, β -*tub*), studied *in vitro* profile of produced secondary toxic metabolites. The dominance of species of the *Niger* section was established (*A. niger*, 90%, and *A. tubingensis*, *A. carbonarius*); then, in decreasing order, the species of section *Flavi* followed (*A. flavus*, 100%), sections *Circumdati* (*A. ochraceus*, 40% and *A. westerdijkiae*, 60%). In section *Fumigati* there was one strain of *A. fumigatus*. Analysis of the profile of toxic metabolites by HPLC-MS/MS in the multi-detection mode showed the production of mycotoxins by the following species: *A. niger* – fumonisin B2 and ochratoxin A, *A. flavus* – aflatoxins B1 and B2 together with sterigmatocystin, *A. westerdijkiae* – ochratoxin A and penicillic acid, *A. ochraceus* – penicillic acid. Amounts of produced MT show a high toxinogenic potential of *Aspergillus* spp. Thus, 20 out of 34 strains produced significant amounts of dangerous, regulated mycotoxins: AFL B1, OTA, FB2. Non-toxinogenic isolates were represented by the species *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. flavus*, and *A. fumigatus*. A study of the species composition and toxinogenic properties of green coffee contaminants of the genus *Aspergillus* using a polyphasic approach was carried out in Russia for the first time.

Keywords: *Aspergillus*, coffee, HPLC-MS/MS, emerging mycotoxins, mycotoxins, PCR, toxinogenicity