

**Кратність середніх концентрацій
аерозолу флотореагенту у повітрі робочої зони до ГДК_{р.з.}
під час промислових випробувань**

Технологічні процеси	Кратність до ГДК _{р.з.} у різні періоди року		
	холодний	перехідний	теплий
Склад реагенту	0,43	0,73	0,93
Дозування флотореагенту	0,90	0,84	0,96
Контактний чан	2,31	3,57	3,74
Основна флотація	1,24	1,34	1,67
Гідроциклон	1,33	1,71	1,68
Магнітна сепарація	0,76	1,03	0,97
Контрольна флотація	1,07	1,26	1,31

брудненням повітря робочої зони флотореагентом до концентрацій, які перевищують ГДК у 28–44 рази, що зумовлене відсутністю вкриття й аспірації на усіх етапах технологічного процесу. При доробці технологічної документації нами були надані відповідні пропозиції щодо запобігання аналогічній ситуації при промисловому процесі.

Ці пропозиції були частково враховані. Результати наших гігієнічних досліджень показали, що при промислових випробуваннях концентрації флотореагенту у повітрі робочих зон знизилися майже у 12 разів (табл. 3). Найбільші перевищення — до 3,74 ГДК_{р.з.} — визначаються в процесі змішування флотореагенту з флотаційною водою, а також при флотації.

Рівні забруднення повітря робочої зони безпосередньо залежать від температури, тобто з підвищенням температури і концентратної пульпи, і повітря підвищується в'язкість флотаційної рідини і відповідно її леткість.

Таким чином, комплекс токсиколого-гігієнічних і санітарно-технічних заходів на напівпромислових етапах впровадження нової гірничо-металургійної технології дозволяє оптимізувати умови праці до санітарних норм.

УДК 577.21:575.17

Н. Е. Кожухова, О. О. Захарова, Ю. М. Сиволап

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ МІКОТОКСИГЕННИХ ФУЗАРІЇВ

Південний біотехнологічний центр в рослинництві, Одеса

Споживання людиною харчових продуктів рослинного походження часто може призводити до захворювань. Зерно хлібних злаків, рослинна сировина, продукти, корм є сприятливим субстратом для розвитку численних видів грибів, у тому числі роду *Fusarium*, які за певних умов можуть стати причиною мікозів і мікотоксикозів. Багато видів *Fusarium*, що уражують зернові культури, продукують фузаріотоксини, які мають нефротоксичні, імуносупресивні та канцерогенні властивості (аліментарно-токсична алейкія, уривська (Кашина — Бека) хвороба, отруєння «п'яним хлібом» та ін.) [1].

Складність проблеми захисту людини від мікотоксикозів посилюється тим, що продукти рослинного походження (зерно і зернопродукти), які містять мікотоксигенні фузарії, не втрачають токсичності протягом багатьох років. Хімічні та біологічні методи виділення і визначення мікотоксинів вельми складні, трудомісткі, не відповідають вимогам масового аналізу [2]. З 1990-х років для виявлення, ідентифікації та оцінки грибів почали використовувати метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [3].

Вищесказане дозволяє вважати пріоритетним: розвиток досліджень у галузі сільськогос-

подарської та медичної мікології, впровадження широко-масштабних заходів щодо захисту рослин від токсичних грибів і селекції стійких генотипів сільськогосподарських культур, проведення ретельного мікологічного і мікотоксикологічного контролю за сільськогосподарською та харчовою продукцією з використанням сучасних технологій.

Повсюдна поширеність грибів роду *Fusarium*, наявність у них патогенних і токсиноутворюючих ознак і пов'язана з цим можливість розвитку грибів, нагромадження мікотоксинів не тільки в період вегетації рослин, а і під час зберігання ви-



значають актуальність розробки ДНК-технології детекції фузаріїв у зерні та харчових виробах рослинного походження, що є **метою** нашого дослідження.

Матеріали та методи дослідження

Матеріалом дослідження були зразки різновидів кукурудзи, кукурудзяних харчових виробів і культур грибів роду *Fusarium* (таблиця). Виділення тотальної ДНК з зерен кукурудзи, кукурудзяних харчових виробів і міцелію грибів проводили згідно з методикою, наведеною у роботі [4]. ПЛР-ампліфікацію родота геноспецифічних фрагментів виконували на ампліфікаторі MIR-D30 ("Sanyo", Японія). Склад реакційної суміші та умови електрофорезу описані у попередніх дослідженнях [5]. Дизайн STS-праймерів і температури відпапу наведено у [6; 7].

Результати дослідження та їх обговорення

Для розробки ДНК-технології детекції фузаріїв у об'єктах рослинного походження попередньо опрацювали етапи ПЛР-аналізу на модельних об'єктах — колекційних штаммах шести видів роду *Fusarium*. У результаті оптимізованої методики ПЛР-аналізу отримано специфічні фрагменти ампліфікації певної довжини, а саме: 431 п. н. — фрагмент при використанні родоспецифічних пар праймерів і 544 п. н. — фрагмент для скринінгу гена *tri5*, що кодує триходієнсінтазу, яка каталізує перший крок біосинтезу трихотеценів.

Результати, отримані на модельних зразках, дозволили використати оптимізовану методику для тестування зерна кукурудзи і продуктів його пере-

робки. Досліджували тотальну ДНК, виділену з розмелених зерен анонімних качанів зубоподібної, крем'янистої, цукрової кукурудзи, з використанням ПЛР з родоспецифічними праймерами *ItsF/R* (рис. 1). Позитивний результат у вигляді наявності фрагментів з молекулярною вагою 431 п. н. виявлено у візуально інфікованих зернах зубоподібної, крем'янистої, цукрової кукурудзи. При тестуванні ДНК із зерен без візуальних симптомів ураження не спостерігалося продуктів ампліфікації ДНК патогену в зразках зубоподібної та крем'янистої кукурудзи, але у зразку ДНК із зерна візуально не ураженої цукрової кукурудзи показано наявність прихованої інфекції.

ПЛР-аналіз ДНК, виділеної з кукурудзяної крупи торговельної марки А (наважки вихідного матеріалу для виділення ДНК

Таблиця

Дослідний матеріал

Тип матеріалу	Дослідні зразки
Зерна качанів різновидів кукурудзи	Зубоподібна, крем'яниста, цукрова
Кукурудзяні харчові вироби	Кукурудзяна крупа, пластівці, консервована кукурудза різних українських виробників (торговельні марки А, Б, В)
Культури грибів роду <i>Fusarium</i>	<i>F. macroceras</i> , <i>F. oxysporum</i> , два штами <i>F. graminearum</i> , два штами <i>F. gibbosum</i> , два штами <i>F. sporotrichiella</i> , два штами <i>F. moniliforme</i>

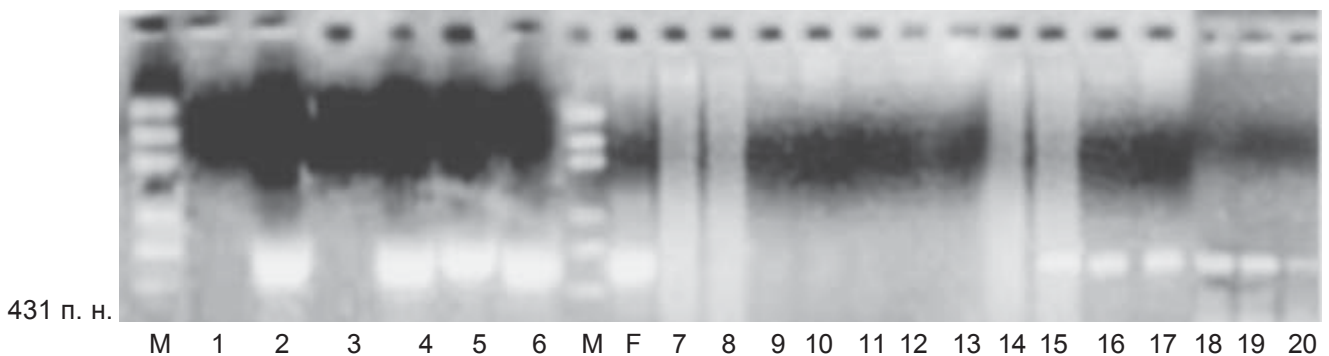


Рис. 1. Електрофорез продуктів ампліфікації тотальної ДНК із зерен качанів зубоподібної (1, 2), крем'янистої (3, 4) та цукрової (5, 6) кукурудзи (без візуальних симптомів інфекції та інфікованих відповідно) і кукурудзяних харчових виробів із родоспецифічними праймерами *ItsF/R*: F — ДНК *F. moniliforme* (позитивний контроль); ДНК із наважок крупи, мг: 7 — 50; 8 — 100; 9 — 150; 10 — 200; 11 — 250; 12 — 300; 13 — 350; ДНК із наважок пластівців, мг: 14 — 50; 15 — 100; 16 — 150; 17 — 200; ДНК із наважок консервованої кукурудзи, мг: 18 — 100; 19 — 150; 20 — 200; М — маркер молекулярної ваги рGEM



масою 50, 100, 150, 200, 250, 300 та 350 мг), пластівців торговельної марки Б (100, 150, 200 мг) і консервованої кукурудзи торговельної марки В (100, 150, 200 мг), з використанням родоспецифічних праймерів показав відсутність фрагментів родоспецифічної ампліфікації у наважках крупи торговельної марки А, що свідчить про неураженість фузаріями даної продукції. Продукт ампліфікації розміром 431 п. н. виявлено у дослідних зразках торговельної марки Б, виділених із 100, 150, 200 мг наважок, тобто ця продукція уражена грибами роду *Fusarium*.

Виявлено, що при збільшенні маси наважки інтенсивність продуктів ПЛР зменшується. Це підтверджує недоцільність використання більшої кількості вихідного матеріалу. З другого боку, зменшена кількість вихідного матеріалу може стати причиною хибнонегативного результату. Так, відсутність ампліфікації у зразку ДНК із наважки 50 мг пластівців торговельної марки Б може зумовлюватися недостатньою кількістю грибної ДНК для здійснення відпалу праймерів. Вищенаведене дозволяє констатувати, що маса оптимальної наважки вихідного матеріалу становить 100 мг. Тестування консервованої кукурудзи торговельної марки В також дозволило виявити наявність інфекції, що продемонст-

рувало можливість контролю якості консервованої продукції методом ДНК-типування.

Другим напрямком виявлення фузаріозного ураження є детекція потенційних токсинопродуктів у рослинних і харчових джерелах. Оптимізація умов ПЛР шляхом добору складу реакційного буфера, концентрації та температури відпалу специфічних праймерів до консервативного регіону *tri5*-гена, що є представником кластеру генів синтезу трихотеценів, дозволило апробувати адекватність їх роботи на вибірці з десяти зразків грибів роду *Fusarium* (рис. 2). За даними фітопатологічного аналізу, штами *F. macroceras* 29, *F. graminearum* ав, *F. gibbosum* 38/в виявили патогенні властивості при контакті з рослиною. За допомогою ПЛР-аналізу отримано продукти ампліфікації завдовжки 544 п. н. саме у даних зразках грибної ДНК, що свідчить про наявність консервативних ділянок *tri5*-гена, тобто дані штами є потенційними токсинопродуктами.

Розроблена двофазна система виявлення фузаріїв, а саме детекція на рівні роду *Fusarium* безпосередньо і генів токсинотворення у геномах даного роду грибів дозволяє проводити експрес-контроль якості рослинної та харчової продукції на наявність інфекції та потенційну токсичність.

ЛІТЕРАТУРА

1. Булай В. И. Фузарии. — К.: Науч. мысль, 1977. — 442 с.
2. Knoll S., Vogel R., Niessen L. Identification of *Fusarium graminearum* in cereal samples by DNA Detection Test Strips™ // Lett. Appl. Microbiol. — 2002. — Vol. 34, N 2. — P. 144-148.
3. Молекулярно-генетичний аналіз популяцій *Fusarium spp.* південного регіону України / О. Дерев'янка, Н. Кожухова, О. Бабаянц, Ю. Сиволап // Вісник ОНУ ім. І. І. Мечникова. — 2004. — Т. 9, вип. 5, № 1. — С. 105-112.
4. Simple and efficient protocol for isolation high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, infected plant tissues / E. Moller, G. Bahnweng, H. Sandermann, H. Geiger // Food Mycol. — 1998. — Vol. 1. — P. 6115-6116.
5. ПЛР-аналіз внутрішньовидового поліморфізму *Fusarium oxysporum* v. *orthoceras* / О. О. Дерев'янка, А. П. Луцкич, О. В. Бабаянц та ін. // Вісн. укр. товариства генетиків і селекціонерів. — 2006. — Т. 4, № 1. — С. 12-20.
6. Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal / B. H. Bluhm, J. E. Flaherty, M. A. Cousin, C. P. Woloshuk // J. Food Prot. — 2002. — Vol. 65, N 12. — P. 1955-1961.
7. Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of *Tri5* by *Fusarium* species in vitro and in planta / F. Doohan, G. Weston, H. Rezanoor et al. // Appl. Environ. Microbiol. — 1999. — N 65. — P. 3850-3854.

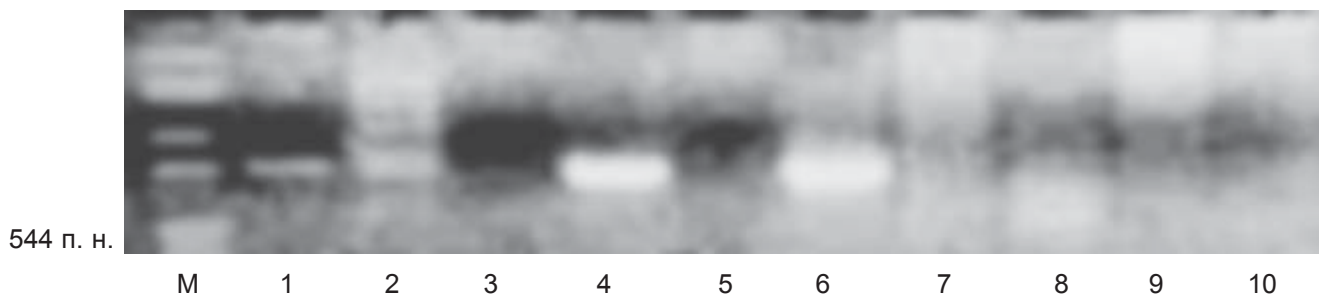


Рис. 2. ПЛР-детекція консервативних ділянок *tri5*-гена у зразках грибної ДНК: 1 — *F. macroceras* 29; 2 — *F. oxysporum* 74; 3 — *F. graminearum* 56a; 4 — *F. graminearum* ав; 5 — *F. gibbosum* 40; 6 — *F. gibbosum* 38/в; 7 — *F. sporotrichiella* 715в; 8 — *F. sporotrichiella* 714в; 9 — *F. moniliforme* 9.9; 10 — *F. moniliforme* 4.3; М — маркер молекулярної ваги pGEM