

УДК 639:615.918:636.5.085

ВАСЯНОВИЧ О.М., канд. с.-г. наук, ст. наук. сп., e-mail: myco-ivm@rambler.ru

САПСАЙ І.С., e-mail: isapsai17@gmail.com

ЯНГОЛЬ Ю.А., e-mail: juliajangol@gmail.com

Інститут ветеринарної медицини НААН

МОНІТОРИНГОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ КОРМІВ НА НАЯВНІСТЬ В НИХ ГРИБНОЇ МІКРОФЛОРИ

*Проведено мікотоксикологічне дослідження 105 зразків кормів. Всього виділено та ідентифіковано 307 штамів грибів, з яких грибів роду *Fusarium* – 78, що становить 25,4 %, *Penicillium* – 69 (22,5 %), *Aspergillus* – 87 (28,4 %), *Alternaria* – 21 (6,8 %), *Mucor* – 17 (11,4 %).*

*Шляхом дослідження штамів на токсичність до тест-об'єкту *Tetrachimena piriformis* встановлено 137 токсичних штамів. Серед грибів роду *Fusarium* – 34 штами токсичні, *Penicillium* – 29, *Aspergillus* – 41 штами.*

В результаті перевірки токсичних штамів на здатність до токсиноутворення було встановлено, що майже всі токсичні штами були продуцентами мікотоксинів.

Ключові слова: мікотоксини, корми, продуценти, плісняві гриби, моніторинг.

Вступ. Серед багатьох факторів навколишнього середовища, які забруднюють корми та продукти харчування, особливе місце займають мікроскопічні плісняві гриби, які є продуцентами мікотоксинів.

Грибами продуцентами мікотоксинів найчастіше уражуються зернові (кукурудза, пшениця, жито, ячмінь, овес, просо) [1].

Використання високоврожайних гібридів зернових та застосування сучасних технологій їх вирощування призвело до швидкого розповсюдження в посівах сільськогосподарських культур токсиноутворюючих грибів і підвищення їх токсичності.

Забруднення зерна та іншої сільськогосподарської продукції можливе на всіх етапах їх виробництва: транспортування, зберігання, переробки та використання, не залежно від території і пори року [2].

Навіть при обґрунтованих методах утримання тварин у господарствах різних кліматичних зон зустрічаються кормові отруєння. Іноді вони мають масовий характер, супроводжуються різким зниженням продуктивності та загибеллю тварин [3].

Широке розповсюдження в природі продуцентів мікотоксинів та стійкість їх до фізико-хімічних факторів створюють реальну небезпеку для здоров'я людей і тварин. Тому проблема моніторингу кормів і продуктів харчування на наявність мікотоксинів і заспореність мікроміцетами залишається актуальною.

Для організації заходів профілактики мікотоксикозів тварин важливо знати склад мікрофлори кормів [4]. Тому, останнім часом увага ветеринарних спеціалістів зосередилась на дослідженні та діагностиці захворювання грибкової етіології сільськогосподарських тварин, вивченні токсичних

властивостей грибів, що найчастіше зустрічаються і здатні викликати кормові отруєння [5].

Мета роботи. Встановити засміченість кормів мікроскопічними пліснявими грибами, дослідити токсигенні властивості ізольованих мікроміцетів та перевірити їх на здатність до токсинування.

Матеріали та методи досліджень. В роботі використовували корми (пшениця, соя, ячмінь, кукурудза, комбікорм, висівки, овес, горох, концентрат, трітале, жито, кормосуміш, жмих соєвий, макуха соняшникова), що надходили з 12 областей протягом 2015 року: Херсонської, Київської, Черкаської, Хмельницької, Одеської, Дніпропетровської, Миколаївської, Полтавської, Запорізької, Кіровоградської, Чернігівської та Житомирської.

Для встановлення загальної заспореності кормів мікроміцетами та визначення їх видового складу, досліджуваний матеріал розкладали на чашки Петрі з агаризованим середовищем Чапека й інкубували при температурі 24°C. Паралельно використовували метод серійних розведень для підрахунку вмісту діаспор грибів в 1 г корму. Кількість колоній підраховували на 7 день культивування. Вміст діаспор розраховували за І. П. Ашмариним та А. А. Воробйовим. Колонії грибів пересівали на скошений агар Чапека та проводили ідентифікацію культур на основі культурально-морфологічних властивостей з використанням визначників грибів [6, 7].

Токсигенні властивості ізольованих мікроміцетів вивчали експрес-методом шляхом дії їхніх культуральних рідин на тест-мікроорганізмі *Tetrachimena piriformis* за ДСТУ 3570-97 [8].

Токсичні штами досліджували на здатність біосинтезувати мікотоксини. Для цього гриби культивували на 10 г стерильного вологого зерна пшениці в колбах при температурі 25–28°C впродовж 14 діб. Екстракцію мікотоксинів проводили етилацетатом, екстракти знежирювали гексаном, випарювали при температурі 45°C на ротаційному випарювачі, наносили на пластинку “Силуфол”, хроматографували в системі розчинників толуол-етилацетат-мурашина кислота (5:4:1) та продивлялись в УФ-променях [9].

Результати досліджень та їх обговорення. При мікотоксикологічному дослідженні кормів було ізольовано та ідентифіковано до виду 307 штамів (табл. 1).

Таблиця 1

Мікобіота кормів

Рід мікроміцетів	Виділено штамів з кормів				
	Всього Загальна кількість	Зернові		Комбікорми	
		Кількість	%	Кількість	%
<i>Aspergillus</i>	87	71	81,6	16	18,4
<i>Penicillium</i>	69	55	79,7	14	20,3
<i>Fusarium</i>	78	61	78,2	17	21,8
<i>Alternaria</i>	21	20	95,2	1	4,8
<i>Mucor</i>	17	11	64,7	6	35,3
Інші	35	31	88,5	4	11,5
Всього	307	249	81,1	58	18,9

Найбільше штамів висівали з зернових кормів, з комбікормів найменше, що може бути пов'язано з термічною обробкою при гранулюванні.

Ідентифікація грибів показала, що серед штамів, ізольованих із проб кормів, найбільше було грибів роду *Aspergillus* – 28,4 %, *Fusarium* – 25,4 % та *Penicillium* – 22,5 %.

В процесі зберігання та використання кормів, видовий склад і кількісне накопичення змінюється: зростає кількість грибів родів *Aspergillus* та *Penicillium* («плісенні зберігання»).

Серед виділених грибів, найбільше токсичних штамів належали до роду *Aspergillus* – 87 штамів та *Fusarium* – 78 штамів (табл. 2).

Таблиця 2

Вивчення токсичності ізольованих штамів мікроміцетів

Назва штаму	Кількість штамів	Токсичні		Слаботоксичні		Нетоксичні	
		Кількість	%	Кількість	%	Кількість	%
<i>Aspergillus</i>	87	41	47,1	36	41,3	10	11,6
<i>Penicillium</i>	69	29	42,0	17	24,6	23	33,4
<i>Fusarium</i>	78	34	43,5	26	33,3	18	23,2
<i>Alternaria</i>	21	9	42,8	8	38,0	4	19,2
<i>Mucor</i>	17	11	64,7	4	23,5	2	11,8
Інші	35	13	37,1	17	48,5	5	14,4
Всього	307	137	44,6	108	35,1	62	20,3

При дослідженні токсичних штамів на токсиноутворення встановлено, що з 307 ідентифікованих штамів 104 – токсичні. Це гриби родів *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, 82 штами (78,85 %) з яких були потенційними продуцентами мікотоксинів (табл. 3).

При вивченні здатності токсичних штамів до токсиноутворення було встановлено 7 штамів грибів роду *Fusarium* здатних продукувати декілька мікотоксинів одночасно. Серед представників роду *Penicillium* встановлено штами, які здатні продукувати мікотоксини афлатоксин В₁ і патулін.

Таблиця 3

Вивчення здатності токсичних штамів до токсиноутворення

Назва штаму	Всього штамів	Виділені мікотоксини					
		Афлатоксин В ₁	Зеараленон	Патулін	Вомітоксин	Т-2 токсин	Фумонізин В ₁ та В ₂
<i>Penicillium</i>	29	5	-	14	-	-	-
<i>Aspergillus</i>	41	22	-	-	-	-	-
<i>Fusarium</i>	34	-	12	-	6	12	11
Всього	104	27	12	14	6	12	11

Також одним із етапів нашої роботи було виявлення мікотоксинів у досліджуваних кормах (табл. 4).

Таблиця 4

Виділені мікотоксини у досліджених кормах

Вид корму	Кількість досліджених проб	Виявлено					
		Афлатоксин В ₁	Зеараленон	Паутлін	Вомітоксин	Т-2 токсин	Фумонізин В ₁ та В ₂
Пшениця	9	-	-	-	1	5	6
Соя	6	-	-	-	-	-	-
Ячмінь	8	-	-	-	1	1	-
Кукурудза	23	17	1	-	-	4	-
Комбікорм	19	6	2	-	1	5	-
Висівки	11	-	2	-	1	9	5
Овес	7	-	3	-	-	1	-
Горох	3	-	-	-	-	-	-
Концентрат	2	1	-	-	1	1	1
Третікале	1	-	1	-	-	1	-
Жито	5	-	1	-	-	4	1
Кормосуміш	2	3	4	-	1	5	5
Жмих соєвий	5	-	-	-	-	-	-
Макуха соняшникова	4	-	-	-	-	-	-
Всього	105	27	14	-	6	45	18

Було встановлено, що найбільша кількість мікотоксинів містилась в зразках кормосуміші, комбікормі та кукурудзі.

Слід відмітити, що не всі проби були забруднені мікотоксинами. Реєструвались проби, з яких виділяли декілька мікотоксинів одночасно. Загалом мікотоксини були виявлені у 18 % від загальної кількості досліджуваних проб.

Проводячи моніторинг, всі спостереження за станом зберігання кормів в різні періоди, можна запобігти економічним збиткам.

Висновки та перспективи подальших досліджень. В результаті проведених досліджень було встановлено, що корми в значній мірі засмічені мікроскопічними пліснявими грибами, що перевищувало допустимі норми. Близько 30 % мікроскопічних грибів, що виділялись з проб, були токсичними по відношенню до *Tetrahymena pyriformis*, а серед токсичних штамів 78,8 % – були потенційними продуцентами мікотоксинів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сапсай І.С. Дослідження рівня контамінації кормів для свиней мікроскопічними пліснявими грибами та мікотоксинами / І.С. Сапсай // Сучасні досягнення в тваринництві та птахівництві: матеріали VII Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених 11–13 вересня 2013 р., с. Мартова, Україна. – Х., 2013. – С. 80–84.
2. Монастырский О. А. Мониторинг токсинообразующих грибов зерновых злаков / О. А. Монастырский // Агрохимия. – 2001. – № 8. – С. 79–87.

3. Труфанова В.О. Частота контамінації мікотоксинами кормів для птиці / В.О. Труфанова // Ветеринарна медицина України. – 2004. – № 9. – С. 26–28.
4. Григоренко М.Є. Моніторинг кормів уражених грибами –продуцентами мікотоксинів / М.Є. Григоренко // Бюлетень Ветеринарна біотехнологія. – 2010. – №17. – С. 66–71.
5. Моніторингові дослідження мікобіоти кормів з різних регіонів України // О.М. Васянович [та ін.] Бюлетень «Ветеринарна біотехнологія». – 2004. – № 4. – С. 27–30.
6. Саттон Д. Определитель патогенных и условно патогенных грибов / Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. // Москва “Мир”. – 2001. – С. 469.
7. Даньшина М.С. Атлас токсичних грибів поражаючих корма / М.С. Даньшина, Н.С. Даньшин, В.Ф. Тимчук // Кишинев. – 1985. – 91с.
8. Міждержавний стандарт. Зерно фуражне, продукти його переробки, комбікорми. Метод визначення токсичності ДСТУ 3570-97/ГОСТ 13496.7-97.- Затв.28.02.98р.№125, введений в дію 01.07.99р.
9. Скринінг-метод одночасного виявлення афлатоксину В₁, патуліну, стеригматоцистину, Т-2 токсину, зеараленону та вомітоксину в різних кормах. – Затв. Держдепартамент. вет. мед. Мін. АПК України 09.04.1996р.

МОНИТОРИНГОВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОРМОВ И НАЛИЧИЕ В НИХ ГРИБНОЙ МИКРОФЛОРЫ / Васянович О.Н., Сапсай И.С., Янголь Ю.А.

Проведено микотоксикологические исследования 105 образцов кормов. Всего идентифицировано 307 штаммов грибов из которых грибов рода Fusarium – 78, что составляет 25,4%, Penicillium – 69 (22,5%), Aspergillus – 87 (28,4%), Alternaria – 21 (6,8%), Mucor – 17 (11,4%).

Путем исследования в тест-объекта Tetrachimena piriformis установлено 137 токсичных штаммов. Среди грибов рода Fusarium – 34 штаммы токсичны, Penicillium – 29 штаммов, Aspergillus – 41 штамм.

В результате проверки токсичных штаммов на способность к токсинообразованию было установлено, что почти все токсичные штаммы были продуцентами микотоксинов.

Ключевые слова: микотоксины, корма, продуценты, плесневые грибы, мониторинг.

MONITORING RESEARCHES OF FORAGE FOR MYCOFLORA AVAILABILITY / Vasjanovych O.M., Sapsay I.S., Jangol Ju.A.

Introduction. Comparing the number of toxic strains and mycotoxins detection rate, we confirm that the more unfavorable storing conditions are the larger amount of mycotoxins. Microscopic molds that produce mycotoxins, take the special place among a great number of environmental factors that pollute forage and foods. The largest number of strains was cultured from the grain feed, and the smallest from mixed feed, that can be explained with thermal treatment of the last one during its granulation. As a result, monitoring of the forage storing at different stages and periods can help prevent economic losses.

The attention of veterinarians is recently paid to the research and diagnosis of the fungiceptology in live-stock animals, the study of toxic characteristics of the most common fungi that can cause diseases.

The goal of the work. To study feed contamination by microscopic fungi, and properties of isolated toxigenic micromycetes and test them for the ability to produce toxin.

Materials and methods. In our research we used feed samples received from 12 oblasts of Ukraine: Kherson, Kyiv, Cherkassy, Khmelnytsky, Odessa, Dnipropetrovsk, Mykolaiv, Poltava, Zaporozhe, Kirovograd, Chernigov and Zhytomyr. Cereal crops (corn, wheat, rye, barley, oats, and millet) are the most frequent contaminated with producers of mycotoxins. Pollution of the crops and

other agricultural goods can occur at every stage of their production, regardless of the territory and season.

Results of research and discussion. 105 samples of forage underwent for micotoxic research. There were identified 307 strains of fungi, which are *Fusarium* – 78 strains (25.4 %), *Penicillium* – 69 strains (22.5 %), *Aspergillus* – 87 strains (28.4 %), *Alternaria* – 21 strains (6.8 %), *Mucor* – 17 strains (11.4 %). Fungi identification showed that among the strains contaminated forage samples *Aspergillus* – (28,4 %), *Fusarium* – (25,4 %) and *Penicillium* – (22,5 %) have been isolated the most often. During forage storing and using, their species composition and concentration can change – the number of fungi *Aspergillus* and *Penicillium* which are “storage fungi” is increased. During the storage strains toxic property increase. It was found 137 toxic strains of all tested samples. There were 34 toxic *Fusarium* strains, 29 *Penicillium* toxic strains and 41 *Aspergillus* toxic strains.

Conclusions and prospects for further research. The research of toxic strains for the ability of toxin production showed that almost all toxic strains were the producers of mycotoxins.

Keywords: mycotoxins, forage, producers, fungi, monitoring.

REFERENCES

1. Sapsaj, I.S. (2013). Doslidzhennja rivnja kontaminacii' kormiv dlja svynej mikroskopichnyh plisnjavnyh grybamy ta mikotoksynamy [Investigation of contamination of feed for pigs microscopic mold fungi and mycotoxins] *Advancements in animal husbandry and poultry: materialy VII Vseukrai'ns'ka naukovo-praktychna konferencija molodyh vchenyh (11–13 veresnja 2013 r.) – 7th National Scientific and Practical Conference of Young Scientists*. (pp 80–84). s. Martova: Instytut tvarynnyctva NAAN [in Ukrainian].
2. Monastyrskij, O.A. (2001). *Monitoryng toksynoobrazujushhyh grybov zernovyh zlakov [Monitoring of toxigenic fungi of cereals]*. Moscow: Agrohymyja [in Russian].
3. Trufanova, V.O. (2004). Chastota kontaminacii' mikotoksynamy kormiv dlja ptyci [The frequency of feed contamination of mycotoxin for poultry]. *Veterynarna medycyna Ukrai'ny – Veterinary Medicine of Ukraine*, 9, 26-28 [in Ukrainian].
4. Vasjanovych, O.M., Korzunenko, O.F., & Obrazhej, A.F. (2004). Monitoryngovi doslidzhennja mikrobioty kormiv z riznyh regioniv Ukrai'ny [Monitoring researches of mycobiota feeds from different regions of Ukraine]. “*Veterynarna biotekhnologija*” – *Bulletin "Veterinary Biotechnology"*, 4, 27-30 [in Ukrainian].
5. Grygorenko, M.J. (2010). Monitoryng kormiv urazhenyh grybamy –producentamy mikotoksyniv [Monitoring fungi infected feed producing mycotoxins] “*Veterynarna biotekhnologija*” – *Bulletin "Veterinary Biotechnology"*, 17, 66-71 [in Ukrainian].
6. Sutton, D., Fotergill, A., & Rinaldi, M. (2001). Determinant of pathogenic and conditionally pathogenic fungi. *Mir – World*, 5-28.
7. Dan'shina, M.S., Dan'shin, N.S., & Timchuk, V.F. (1985). Atlas toksichnih Gribov porazhajushhyh korma [Atlas of toxic fungi affecting fodder] Kishinev [in Russian].
8. Mizhderzhavnij standart. Zerno furazhne, produkti jogo pererobki, kombikormi. Metod viznachennja toksichnosti [Interstate standard. Forage and its derived products. The method of determining toxicity]. (1999) *HOST 13496.7-97 from 28th February 1999*. Moscow: Standartinform Rossiiskoi Federatsii [in Russian].
9. Skryning-metod odnochasno vyjavlennja aflagoksynu B₁, patulinu, sterygmatocystynu, T-2 toksynu, zearalenonu ta vomitoksynu v riznyh kormah [Screening method for the detection of aflatoxins B₁, patulin, sterigmatocystin, T-2 toxin, zearalenone and vomitoxin in feeds]. (1996). *Guidlines*. Kyiv: Derzhdepartament. vet. med. Min. APK Ukrai'ny [in Ukrainian].