

УДК: 639:615.9:636.085

ВАСЯНОВИЧ О.М., канд. с.-г. наук, ст.наук. сп., e-mail: myco-ivm@rambler.ru,
РУДА М. Є., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: rudayamargo@gmail.com,
ЯНГОЛЬ Ю.А.*, e-mail: juliajangol@gmail.com
Інститут ветеринарної медицини НААН

УРАЖЕННЯ ЗЕРНОВИХ КОРМІВ МІКРОСКОПІЧНИМИ ПЛІСНЯВИМИ ГРИБАМИ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

*Проведено мікотоксикологічні дослідження 165 зразків зернових кормів, з яких ізольовано та ідентифіковано до виду 420 штамів мікроміцетів. Встановлено, що гриби роду *Fusarium* складали 23,5 % від загальної кількості досліджених проб, *Penicillium* – 21,9, *Aspergillus* – 20,4 %. Дослідженнями на тест-об'єкті *Tetrachimena pyriformis* встановлено, що із 277 досліджених 140 штамів були токсичними. В результаті вивчення здатності до токсиноутворення токсичних штамів грибів роду *Fusarium* було виділено продуцентів фумонізинів – 18,03 %, зеараленону – 14,75, Т-2 токсину – 11,47 та вомітоксину – 6,5 %.*

Ключові слова: мікроміцети, зерно, мікологічні дослідження, фузаріоз, фузаріотоксини.

Вступ. Мікотоксикози – це поширені специфічні захворювання тварин та птиці, етіологічними факторами яких є токсиноутворюючі мікроскопічні гриби та продукти їх метаболізму – мікотоксини. Їх широкому розповсюдженню на території України сприяє географічне розташування та кліматичні умови. Відомо більше 300 видів грибів-продуцентів мікотоксинів. Особливо небезпечними серед них вважають гриби родів *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*. Вони відзначаються високою загальною токсичністю, імуносупресивною дією, а також мутагенними властивостями. За сприятливих для їх росту умов (вологість, відповідна температура і та ін.), особливо в окремі роки, гриби масово уражують рослини, грубі та зернові корми, продовольчу сировину та продукти харчування, що обумовлює іноді масові захворювання не тільки тварин, але і людей [1].

Незважаючи на те, що мікотоксикологія досягла значних успіхів в різних напрямках свого розвитку, забезпечити надійну профілактику мікотоксикозів тварин та людей жодній країні поки що не вдалося. Адже проблема ураження біологічних субстратів, тварин та людей мікотоксинами є багатоскладовою і включає ряд біологічних, хімічних, медичних, ветеринарних, сільськогосподарських та екологічних аспектів [2].

Відомо, наприклад, що 25 % зерна, що виробляється у світі пошкоджено токсичними грибами, а щорічні світові витрати від ураження грибами та забруднення мікотоксинами сільськогосподарської продукції сягають понад 18 млрд доларів. Таким чином, усвідомлення реальної небезпеки для здоров'я людей і тварин, широке розповсюдження грибів-продуцентів мікотоксинів та

*Аспірант, науковий керівник – канд. с/г наук **О.М. Васянович**

значні економічні збитки, обумовлюють пріоритетність проблеми мікотоксикозів у всьому світі [3].

Одними із широко розповсюджених є гриби роду *Fusarium*, які часто виявляються на полях до збирання врожаю і які здатні продукувати різноманітні мікотоксини: трихотецени, фумонізени, зеараленон, моніліформін, фузарієву кислоту та інші [4]. Мікотоксини грибів роду *Fusarium spp.* традиційно асоціювалися із зерновими, що вирощені в помірному кліматі, оскільки ці мікроміцети потребують більш низьких температур для росту і продукування мікотоксинів. Але дослідження проведені багатьма науковцями за останні десятиріччя, свідчать про те, що *Fusarium* пристосувалися не лише до кліматичних умов помірного клімату, вони широко розповсюдились, як в північних так і в південних регіонах, що пояснюється їх високою адаптаційною здатністю.

Метою даної роботи було вивчення розповсюдження грибів на зернових кормах, встановлення їхньої видової приналежності, токсигенних характеристик та частоти виявлення мікотоксинів.

Матеріали та методи досліджень. Для роботи відібрано та досліджено 165 зразків різних видів зернових кормів (пшениця, кукурудза, ячмінь, овес).

Для визначення видового складу мікроскопічних грибів, досліджуваний матеріал розкладали на чашки Петрі з агаризованим середовищем Чапека й інкубували за температури $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Колонії грибів пересівали на скошений агар Чапека та проводили ідентифікацію культур на основі культурально-морфологічних властивостей із використанням визначників грибів [5–7].

Токсичні властивості ізольованих грибів вивчали шляхом дії їхніх культуральних рідин на тест-мікроорганізм *Tetrachimena pyriformis* під час змішування в об'ємному співвідношенні 1:1. Результати визначали й оцінювали через 30 і 60 хв, враховуючи ефект біопроби в краплі. Токсичні штами спричиняли загибель *Tetrachimena pyriformis* протягом 30 хв, слаботоксичні – 1 год, нетоксичні – загибелі та будь-яких морфологічних змін в інфузорій не викликали [8].

Вивчали здатність токсичних штамів утворювати мікотоксини (фумонізени, Т-2 токсин, зеараленон та дезоксиніваленон). Для цього гриби культивували на 10 г стерильного вологого зерна кукурудзи в колбах за температурі $26 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 18–21 днів, а для стимуляції утворення Т-2 токсину – ще два тижні при температурі 4°C . Екстракцію мікотоксинів проводили етилацетатом, екстракти знежирювали гексаном.

Дослідження на наявність мікотоксинів проводили методом тонкошарової хроматографії згідно «Скринінг-методу одночасного виявлення афлатоксину В₁, патуліну, стеригматоцистину, Т-2 токсину, зеараленону та дезоксиніваленону» [9]. Екстракт наносили на пластину «Sorbfil», «Силуфол УФ-254», хроматографували в системі розчинників толуол-етилацетат-мурашина кислота (5:4:1). Після висушування хроматографували та продивлялись в УФ-променях з довжиною хвилі 365 нм. Для виявлення мікотоксину зеараленону пластину обробляли 20%-вим спиртовим розчином

$AlCl_3$ з наступним нагріванням за температури $80^\circ C$ протягом 5 хв., наявність Т-2 токсину виявляли шляхом обробки пластин 20%-вим спиртовим розчином сірчаної кислоти та витримуванням за температури $130^\circ C$ протягом 1–3 хв. Наявність Т-2 токсину відмічали у вигляді плями голубого кольору з Rf, яке дорівнює Rf стандарту Т-2 токсину (0,29). Для виявлення афлатоксину B_1 пластину продилялися в УФ-променях із довжиною хвилі 254 і 365 нм. Наявність афлатоксину B_1 в екстракті, який досліджувався відмічають у вигляді плями синього кольору на фоні флуоресціюючої пластини з Rf, що дорівнює Rf стандарту афлатоксину B_1 (0,36). Для виявлення вомітоксину пластину обробляли 10% спиртовим розчином алюмінію хлористого з послідовним нагріванням при температурі $93^\circ C$ протягом 15 хв та продилялися в УФ-променях із довжиною хвилі 365 нм. За наявності вомітоксину відмічали на пластинці плями блакитного кольору з Rf, що дорівнює Rf стандарту вомітоксину (0,2).

Результати досліджень та обговорення. При мікотоксикологічних досліджень кормів було ізольовано та ідентифіковано 420 штамів грибів. Досліджуючи ізольовані мікроскопічні гриби, було виділено таку відсоткову кількість мікроміцетів родів: *Aspergillus* – 20,4; *Penicillium* – 21,9; *Fusarium* – 23,5; *Alternaria* – 20,6 (табл. 1).

Таблиця 1

Моніторингові дослідження мікобіоти кормів 2015-2016 рр.

Рід мікроміцетів	Всього виділено	
	кількість	%
<i>Aspergillus</i>	86	20,4
<i>Penicillium</i>	92	21,9
<i>Fusarium</i>	99	23,5
<i>Alternaria</i>	87	20,6
Інші	47	11,2
Всього	420	100

У процесі роботи ізольовані мікроміцетів перевірені на токсичність до тест-об'єкту *Tetrachimena pyriformis* (табл. 2). Серед відібраних 86 штамів грибів роду *Aspergillus* токсичних було 41 штаб, слаботоксичних – 29 та 16 нетоксичних штамів. Із 92 перевірених ізольованих штамів *Penicillium* – 38 токсичних, 26 – слаботоксичних та 28 – нетоксичних ізольованих.

Таблиця 2

Результати вивчення токсичності мікроміцетів

Роди грибів	Перевірено штамів	Токсичність мікроміцетів					
		З них					
		токсичні		слаботоксичні		нетоксичні	
		Кіл-ть	%	Кіл-ть	%	Кіл-ть	%
<i>Aspergillus</i>	86	41	47,67	29	33,72	16	18,61
<i>Penicillium</i>	92	38	41,30	26	28,26	28	30,44
<i>Fusarium</i>	99	61	61,61	23	23,23	15	15,16
Всього	277	140	50,54	78	28,17	59	21,29

Серед грибів роду *Fusarium* токсичних виявили 61 штам, слаботоксичних – 23 та нетоксичних – 15 штамів.

Токсичну дію до тест-мікроорганізму *Tetrachimena pyriformis* виявлено у 140 штамів мікроміцетів (50,54 %), слаботоксичну – у 78 (28,17 %). Найбільше токсичних штамів виявляли у грибах роду *Fusarium* (61% від загальної кількості токсичних).

Всі токсичні штами грибів роду *Fusarium* було перевірено на здатність їх продукувати мікотоксини: Т-2 токсин, вомітоксин (ДОН), зеараленон та фумонізину.

Найбільш активних штамів було виділено з грибів роду *Fusarium*, які виявлялись продуцентами фумонізинів – 18,03%, зеараленону – 14,75%, Т-2 токсину – 11,47% та вомітоксину – 6,55%.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Встановлено, що зернові корми часто вражені мікроміцетами: *Penicillium* – 21,9%, *Fusarium* – 23,5%, *Aspergillus* – 20,4% та ін.

При вивченні токсичності, найбільшу кількість токсичних штамів було виявлено серед грибів роду *Fusarium*. Всі токсичні штами цих грибів є продуцентами фузаріотоксинів: Т-2 токсину, фумонізинів, зеараленону та вомітоксину.

У подальшій роботі найбільш активні штами-продуценти мікотоксинів будуть використані у виробництві стандартів мікотоксинів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Васянович О.М. Моніторингові дослідження мікобіоти кормів з різних регіонів України / О.М. Васянович, О.Ф. Корзуненко, А.Ф. Ображей та ін. // Ветеринарна біотехнологія. – 2003. – Вип. 4. – С. 27–30.
2. Погребняк Л.І. Мікотоксикози сільськогосподарських тварин, їх діагностика та профілактика / Л.І. Погребняк // Актуальні проблеми ветеринарної фармакології і токсикології: Зб. матер. І Всеукр. наук.-метод. конф. вет. фармакологів і токсикологів, 20–22 жовтня, 1998 р., м. Київ. – К., 1998. – С. 67.
3. Рухляда В.В. Поширення мікроміцетів на зернових кормах та їх токсигенні властивості / В.В. Рухляда, М.М. Кулініч, С.Тарануха та ін. // Ветеринарна медицина України. – 2001. – №6. – С. 44–45.
4. Мікотоксикологічний моніторинг концентрованих кормів лісостепу України / О.Малінін, О.Куцан, Г.Шевцова, О.Семеріна // Тваринництво України. – 2003. – №12. – С. 26–28.
5. Билай В.И. Фузариин / В.И. Билай // Киев: Наук. Думка. – 1977. – 433 с.
6. Ашмарин И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев // Л. – 1962. – 180 с.
7. Саттон Д. Определитель патогенных и условно патогенных грибов / Д. Саттон, А. Фотергил, М. Ринальди // М.: Мир. – 2001. – 467 с.
8. Міждержавний стандарт. Зерно фуражне, продукти його переробки, комбікорми. Метод визначення токсичності ДСТУ 3570-97 (ГОСТ 13496.7-97). Затверджений 28.02.98. – Уведений в дію 1.07.99 р.
9. Скринінг-метод одночасного виявлення афлатоксину В₁, патуліну, стеригматоцистину, Т-2 токсину, зеараленону та вомітоксину в різних кормах. – Затв. Держдепартам. вет. мед. Мін. АПК України 09.04.1996 р.

ПОРАЖЕНИЕ ЗЕРНОВЫХ КОРМОВ МИКРОСКОПИЧЕСКИМИ ПЛЕСНЕВЫМИ ГРИБАМИ НА ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ / Васянович О.Н., Рудая М.Е., Янголь Ю.А.

Проведены микотоксикологические исследования 165 образцов зерновых кормов, из которых изолировано и идентифицировано к виду 420 штаммов микромицетов. Установлено, что грибы рода *Fusarium* составляли 23,5% всех исследуемых проб, *Penicillium* – 21,9%, *Aspergillus* – 20,4%. Исследования на тест-объекте *Tetrachimena pyriformis* показали, что из 277 исследованных – 140 штаммов были токсичными. Наибольшее количество активных штаммов было выделено из грибов рода *Fusarium*, которые представлены продуцентами фумонизинов в процентном соотношении – 18,03, зеараленона – 14,75, Т-2 токсина – 11,47 и vomitоксина – 6,55%.

В будущей работе наиболее активные штаммы-продуценты микотоксинов будут использованы при производстве стандартов микотоксинов.

Ключевые слова: микромицеты, зерно, микологические исследования, фузариоз, фузариотоксины.

GRAIN CONTAMINATION BY MICROSCOPIC FUNGI IN UKRAINE / Vasjanovych O.M., Ruda M.E., Jangol Ju.A.

Introduction. Mycotoxicoses – common specific diseases of animals and poultry, the etiological factors of which are microscopic fungi and their metabolic products called mycotoxins.

Particularly dangerous among them are *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*. They are characterized by high general toxicity, immunosuppressive effect and mutagenic properties.

One of them is *Fusarium* fungi, which often found in the fields before harvest and are able to produce various mycotoxins: tryhotecens, fumonisins, zearalenone, moniliformin, fusarii acid and others.

Studies conducted by many scientists over the past decade indicate that *Fusarium* adapted not only to the climate temperature, they are widely spread both in northern and in southern regions due to their high adaptic solution.

The goal of the work. To study the distribution of fungi in cereal feed, establish their identity, toxigenic characteristics and frequency of mycotoxins detection.

Materials and methods. 165 samples of various types of feed grains (wheat, corn, barley, oats) were studied in 2015–2016 in the laboratory of mycotoxicology. Micromycetes species diversity and their toxicity properties were studied.

Results of the study and discussion. Mycotoxicology study of 165 samples of feed grains was conducted. Among them *Fusarium* fungi was found in 23.5% of samples.

Due to the *Tetrachimena pyriformis* test it was detected that among 227 micromycetes cultures 140 were toxic. The most toxic strains were observed in *Fusarium* – 61%.

Conclusions and prospects further research. It was detected that corn feed is often contaminated with micromycetes culture: *Penicillium* in 21.9%, *Fusarium* – 23.5, *Aspergillus* in 20.4% and others. Toxicological investigation confirm 140 strains were toxic regarding *Tetrachimena pyriformis*.

In studying toxicity, the largest number of toxic strains were identified among *Fusarium* genus. All toxic strains of these fungi were producers fusariotoxins: T-2 toxin, fumonisins, zearalenone and vomitoxin.

In future work, the most active producers of mycotoxins will be used in the production of mycotoxins standards.

Keywords: micromycetes, grain, mycology researches, fusariosis, toxins of *Fusarium*

REFERENCES

1. Vasjanovich, O.M., Korzunenko, O.F., & Obrazhej, A.F. (2003). Monitoringovi

doslidzhennja mikrobioti kormiv z riznih regioniv Ukraïny [Monitoring researches of mycobiota feeds from different regions of Ukraine]. *Veterinarna biotechnologija – Veterinary Biotechnology*, 4, 27-30 [in Ukrainian].

2. Pogrebnjak, L.I. (1998). Mikotoksikozi sil'kogospodars'kih tvarin, ih diagnostika ta profilaktika [Mycotoxicoses of animal, treatment and prevention] Proceedings of the actual problems of veterinary pharmacology and toxicology: *materialy I Vseukr. naukovo-metodychna konferencija veterynarna farmakologiv i toksikologiv* (20-22 zhovtnja, 1998 r.). Kiev [in Russian].

3. Ruhljad, V.V., Kulinich, M.M., & Taranuha, S. (2001). Poshirennja mikromicetiv na zernovih kormah ta ih toksigenni vlastivosti [Dissemination of micromycetes on cereals and feed and their toxigenic properties]. *Veterinarna medicina Ukraïny –Veterinary Medicine of Ukraine*, 9, 44-45 [in Ukrainian].

4. Malinin, O., Kucan, O., & Shevcova, G., et al. (2003). Mikotoksikologichnij monitoring koncentrovanih kormiv lisostepu Ukraïny [Mycotoxicological monitoring of concentration feed of Ukraine]. *Tvarinnictvo Ukraïni – Stockbreeding of Ukraine*, 12, 26-28 [in Ukrainian].

5. Bilaj, V.I. (1977). *Fuzarii [Fusarium]*. Kiev: Nauk. Dumka [in Russian].

6. Ashmarin, I.P., & Vorob'ev, A.A. (1962). Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovanijah [Statistical methods in microbiological studies]. Lviv [in Russian].

7. Satton, D., Fotergil, A., & Rinal'di, M. (2001). Determinant of pathogenic and conditionally pathogenic fungus. *Mir – World*, 5-28 [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 Rossijskoj Federatsii [in Russian].

9. Skryning-metod odnochasnogo vijavlennja aflatoksynu B₁, patulinu, sterygmatozystynu, T-2 toksynu, zearalenonu ta vomitoksinu v riznyh kormah [Screening method for the detection of aflatoxins B₁, patulin, sterigmatocystin, T-2 toxin, zearalenone and vomitoxin in feeds]. (1996). Zatv. Derzhdepartam. vet. med. Min. APK Ukraïny [in Ukrainian].

УДК 619:614.31:631.57

ГАРКАВЕНКО Т.О., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: bac@vetlabresearch.gov.ua,

АЗИРКІНА І.М., e-mail: microb_antib@ukr.net,

ОРДИНСЬКА Д.О., e-mail: bac@vetlabresearch.gov.ua,

ГАРКАВЕНКО В.М., e-mail: bac@vetlabresearch.gov.ua

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ КОНТРОЛЮ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ ЗБУДНИКІВ ІНФЕКЦІЙНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ТВАРИН В УКРАЇНІ

Дослідження чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів – запорука успішного лікування бактеріальних захворювань тварин та птиці. Найбільшою проблемою сучасної медицини є антибіотикорезистентність основних збудників інфекційних захворювань. Тому виникла необхідність використовувати ці дані для успішного лікування.