metodychni rekomendacii' [Application of immunoflluorescent test in lab diagnostics of animal pseudomonosis]. *Guidelines.* Kyiv, NULES of Ukaine [in Ukrainian].

7. Makarov, V.V. & Nedosekov, V.V. (2010). Dokazatelnaya epizootologiya [Evidence based epizootology]. *Bulletin Veterynarna biotehnolohia – Bulletin of Veterinary biotechnology*, 17, 143–149 [in Russian].

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: rudaspass@gmail.com,
САПЕЙКО В.П., канд. вет. наук, e-mail: v.sapeyko@gmail.com,
ЯНГОЛЬ Ю.А.*, e-mail: juliajangol@gmail.com
Інститут ветеринарної медицини НААН
БРЕЗВИН О.М., д-р вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: brezvun@gmail.com
ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок

ВИВЧЕННЯ БІОСИНТЕЗУ ГРИБІВ РОДУ *FUSARIUM MONILIFORME SHELDON* ЗДАТНИХ ПРОДУКУВАТИ МІКОТОКСИНИ-ФУМОНІЗИНИ

У статті наведені дані щодо вивчення найбільш оптимальних параметрів біосинтезу мікотоксинів – фумонізинів, грибом роду Fusarium moniliforme на зерновому субстраті зерна кукурудзи, пшениці та рису. Визначено, що найбільш інтенсивний біосинтез токсину відбувався на зерні кукурудзи штамом F. moniliforme № 168 і складав 220 мг фумонізину на кг досліджуваного субстрату за вологості 70%. На пшениці найкращим продуцентом був штам F. moniliforme № 298, який продукував 120 мг фумонізину на кг. На зерновому субстраті рису накопичення мікотоксину по відношенню до інших досліджених субстратів було не значним і становило від 25 до 90 мг/кг.

Ключові слова: *мікроміцети, фумонізини, мікотоксини, мікотоксикологічні дослідження.*

Вступ. Найнебезпечніші фітопатогенні токсиноутворюючі гриби роду *Fusarium*, які впливаючи на генеративні органи злакових культур, не тільки уражають зерно і забруднюють його мікотоксинами в період вегетації, а і продовжують розвиток на зерні при зберіганні, збільшуючи вміст в ньому фузаріотоксинів. Всі фузаріотоксини володіють чітко вираженою антибіотичною дією по відношенню до потенційних конкурентів, що і сприяє підвищенню токсигенності фузаріїв [1, 2].

Встановлено, що штами збудника фузаріозу колосу ніколи не виділяються у представників диких злаків. Тільки рослини високопродуктивних сортів пшениці індукують високу токсигенність фузаріїв і підтримують штами-суперпродуцентів фузаріотоксинів. Токсигенність штамів підвищується при переході з одного сорту на інший, а також при зміні субстрату (з рису на кукурудзу, пшеницю). Це пояснюється тим, що виражене токсиноутворення –

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

адаптивна ознака, оскільки неживий харчовий субстрат завжди приваблює велику кількість мікроорганізмів-конкурентів [3, 4].

Фумонізини – це група мікотоксинів, які продукуються плісеневими грибами родів *Fusarium verticilliodes, Fusarium proliferatum* та *Fusarium moniliforme.* Вони відрізняються за морфологічними ознаками макро- й мікроконідій і за наявністю чи відсутністю хламідоспор. Патогенний комплекс збудників фузаріозу залежить від різних чинників: зони вирощування озимої пшениці та кукурудзи, метеорологічні умови року, фізіологічний стан рослин, стійкість сорту тощо. Захворювання проявляється протягом усього періоду вегетації: починаючи від фази сходів, у вигляді фузаріозної кореневої гнилі, далі, за сприятливих умов, може розпочатися випрівання озимих хлібів у вигляді снігової (або фузаріозної) плісняви, фузаріоз листкових пластинок, піхви листків, вузлів, інколи основи стебел (недостатньо вивчена хвороба). До моменту визрівання хлібів гриби утворюють грибницю й конідіальне спороношення у вигляді рожевих подушечок на колосі та зерні [5, 6].

Ці мікотоксини в основному уражують кукурудзу, отже, містяться в кормах для тварин на основі вже ураженої рослини. Загалом, фумонізини зустрічаються у країнах із тропічним та субтропічним кліматом, наприклад, у Бразилії країнах Південно-Східної Азії та Південної Європи. Але останнім часом, у зв’язку з глобальним потеплінням клімату, фумонізини стали звичним явищем і у країнах ЄС та СНГ. Фумонізин B_1 є найбільш розповсюдженим та вивченим у цій групі. Фумонізин B_1 у кормі – причина багатьох аномалій у тварин, наприклад, лейкоенцефаломаляції коней або набряку легень у свиней, які вже давно зв’язували з довготривалим споживанням кормів низької якості.

Фумонізин B_1 є токсичним для печінки, нирок та серцево-судинної системи усіх видів тварин, викликає патологію мітозу в уражених тканинах із наступною загибеллю клітин (апоптоз). B_1 як і інші фумонізини блокує механізм переносу глюкози за рахунок інгібування ферменту глюкоцерамідсинтази та порушує метаболізм сфінголіпідів, якими насичена нервова тканина і які захищають клітинні мембрани від негативного впливу. Порушення метаболізму сфінголіпідів та інгібування глюкоцерамідсинтази лежить в основі механізму токсичності фумонізинів [7, 8].

Загалом економічні збитки від мікотоксинів визначаються прямими втратами продуктів харчування і кормів, зниженням їх харчової та кормової цінності, а також загибеллю тварин, підвищенням чутливості їх до інфекційних захворювань, витратами на проведення мікотоксикологічних досліджень та детоксикації забруднених кормів і продуктів харчування [9].

Отже, проведення постійного токсикологічного контролю кормів дає змогу захистити тварин від отруєння і зменшити шкідливий вплив токсичних речовин на людей і довкілля.

Метою нашої **роботи** було вивчення біосинтезу гриба роду *Fusarium moniliforme Sheldon,* здатного продукувати мікотоксини-фумонізини.

Матеріали та методи досліджень. При постановці досліду було використано гриб-продуцент *Fusarium moniliforme Sheldon*, який вирощували на

зерні пшениці, рису та кукурудзи за різної температури, різної вологості та тривалості культивування. Для вивченні здатності грибів продукувати фумонізини використовували «Методику визначення фумонізинів B_1, B_2 в кормах методом тонкошарової хроматографії» [10].

Всі токсичні штами відносно Тетрахімени піріформіс пересівали на косяки з твердим поживним середовищем Чапека, інкубували в термостаті при температурі 27°С протягом 7 діб. Потім у колби засипали пшеницю, кукурудзу та рис по 100 г, додавали 20–80 мл дистильованої води, стерилізували при 1 атм. 1 годину. Після стерилізації в розрихлене зерно додавали стерильну культуру гриба-продуцента (суспензія в 5 мл стерильної води). Посіви штамів грибів роду *Fusarium* інкубували 14 діб в термостаті при різних температурі (+4°С; +37°С), та додатково 18 днів в холодильнику (при температурі 3–5°С). Після інкубування культури гриба на зерні робили наважки в кількості 10 г, поміщали в колби та екстрагували 20 мл етилацетату протягом 1 години. Екстракти фільтрували через паперовий фільтр, випарювали до сухого залишку та перерозчиняли в 1 мл ацетонітрилу. Отримані екстракти перевіряли на наявність фумонізинів.

Сухий залишок розчиняли в 50 $см^3$ хлороформу і вносили в ділильну лійку, потім додавали 50 $см^3$ ацетонітрилу і 20 $см^3$ 4% водного розчину хлориду калію. Вміст колби ретельно перемішували. Після повного розділу шарів, нижній шар (хлороформений) зливали і фільтрували через фільтрувальний папір, на який попередньо наносять 10–12 г безводного сульфату натрію. Фільтр 2 рази промивали порціями хлороформу по 20 $см^3$. Очищений екстракт випарювали у вакуумі при температурі 60 °С досуха.

Отриманий залишок екстракту перерозчиняли у хлороформі, переносили у калібрувальну пробірку на 10 $см^3$ і доводили загальний об'єм екстракту хлороформом до мітки – 3 $см^3$.

Для якісного визначення фумонізинів, на хроматографічну пластину «Сорбфіл» на відстані 1,5–2 см один від одного, від нижнього та бокових країв пластини, наносили розчин екстракту в кількості 2, 5, 10 та 15 мкл. Одночасно з досліджуваними пробами на пластину наносили 2, 5, 10 мкл стандартного розчин фумонізину B_1. Діаметр плям нанесених досліджуваних проб повинен відповідати діаметру плям стандартних проб.

Пластину поміщали в хроматографічну камеру і хроматографували в системі ацетонітрил – вода – оцтова кислота (50:50:1). Коли фронт розчинника піднімався на висоту 10–12 см від старту, пластини виймали і сушили при кімнатній температурі та обробляли декагідратом нітраборатом натрію разом з флуоресцамінатом розчинним в ацетонітрилі. Через 1 хвилину пластину обробляли 0,1 М сумішшю борної кислоти та ацетонітрилу (40:60). Пластину підсушували на повітрі і розглядали в УФ променях, при довжині хвилі 335 нм. Фумонізини виявляли візуальним порівнянням із стандартами B_1, B_2 з Rf 0,5 і 0,1 відповідно, що проявлялися яскравим жовтувато-зеленим кольором.

Результати досліджень та їх обговорення. Проведеними у лабораторії дослідженнями встановлено, що біосинтез фузаріотоксинів залежить від

токсичності гриба-продуцента, умов його культивування, виду субстрату, температури, вологості і тривалості культивування.

На основі даних інших дослідників було використано 3 зернових субстрати: кукурудзу, пшеницю і рис.

Посіви інкубували за температури 24°С протягом 14 діб у термостаті та упродовж 14 діб у холодильнику при 4°С. Досліди показали, що гриб *F. moniliforme* накопичував фумонізини на різних досліджуваних зернових субстратах по-різному.

На рисунку 1 та 2 показано пляшки із нарощеною культурою гриба-продуцента *Fusarium moniliforme Sheldon* на зернових субстратах та пробірки із досліджуваним штамом.

Рис. 1. Культура гриба-продуцента *Fusarium moniliforme Sheldon.*

Рис. 2. Ріст гриба-продуцента *Fusarium moniliforme Sheldon* на середовищі Чапека.

Гриб *Fusarium moniliforme Sheldon* утворює ватоподібні колонії з білим повітряним міцелієм, які мають переважно легкий червоний відтінок. Зворотній бік або не має кольору, або є темно-червоним в залежності від субстрату та токсичності самого штаму. Гіфи блідо-оливкового кольору.

При вивченні інтенсивності накопичення фузаріотоксинів грибами роду *F. moniliforme* було встановлено, що найбільш інтенсивний біосинтез токсину проходив на зерні кукурудзи (табл. 1).

Таблиця 1

Інтенсивність накопичення фузаріотоксинів грибами роду *F. Moniliforme*

Назва гриба-продуцента	№ штаму	Кількість фумонізинів на різних субстратах, мг/кг		
		Кукурудза	Пшениця	Рис
F. moniliforme	17	сліди	80	65
F. moniliforme	31	100	40	45
F. moniliforme	32	80	30	35
F. moniliforme	91	100	75	25
F. moniliforme	134	сліди	40	30
F. moniliforme	168	220	70	30
F. moniliforme	171	185	75	45
F. moniliforme	234	190	90	40
F. moniliforme	293	120	80	45
F. moniliforme	298	205	120	90
F. verticilloides	301	145	90	85

Деякі штами гриба-продуцента утворювали слідову кількість мікотоксину, а штам *F. moniliforme* № 168 продукував 220 мг фумонізину на кг досліджуваного субстрату.

При дослідженні зернового субстрату – пшениці було встановлено, що всі продуценти майже рівномірно накопичували мікотоксини фумонізини, але найкращим продуцентом серед досліджених був штам *F. moniliforme* № 298.

Біосинтез мікотоксину фумонізину на зерновому субстраті рису відбувався слабо по відношенню до інших досліджених субстратів, і становив від 25 до 90 мг/кг субстрату.

Таким чином, дослідження показали, що стерильне зерно кукурудзи є кращим субстратом для культивування гриба роду *F. moniliforme* з метою біосинтезу фузаріотоксинів – фумонізинів.

Висновки та перспективи подальших досліджень. В результаті проведеної роботи з вивчення біосинтезу гриба роду *Fusarium moniliforme Sheldon* було встановлено, що біосинтез фузаріотоксинів залежить від токсичності гриба-продуцента, умов його культивування, виду субстрату, температури, вологості, а також тривалості культивування.

При дослідженні було використано три зернові субстрати та встановлено, що накопичення фумонізинів грибом *Fusarium moniliforme* на них відбувалося по-різному. Найбільш інтенсивно біосинтез токсину проходив на зерні кукурудзи і складав 220 мг/кг досліджуваного субстрату.

У результаті роботи було підібрано температурний режим культивування грибів, який складає 24°С протягом 14 діб у термостаті й упродовж 14 діб у холодильнику за температури 4°С та при вологості субстрату – 70%. У подальшій роботі буде проводитись нарощення культури гриба для виділення чистого стандарту фумонізину B_1.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Тремасов М.Я. Изучение токсикогенеза *F. sporotrichiella* при повышенной температуре культивирования / М.Я. Тремасов, А.И. Сергейчев, А.З. Равилов // Микол. и фитопатол. – 2000. – Т. 34. – Вып. 4. – С. 59–62.

2. Билай В.Й. Фузарии / В. Й. Билай. – К.: Наукова думка. – 1977. – 441 с.

3. Петенко А.И. Обеспечение биологической безопасности кормов / А.И. Петенко, В.А. Ярошенко, А.Г. Кощаев, А.К. Карганян // Ветеринария. – 2006. – №7 – С. 7–11.

4. Иванов А.В. Микотоксикозы животных (этиология, диагностика, лечение, профилактика) / А.В. Иванов, М.Я. Тремасов, К.Х. Папуниди, А.К. Чулков / под ред. Иванова А.В. – М.: Колос. – 2008. – 140 с.

5. Buerstmayr H. Novel tools for developing *Fusarium* resistant wheat for Europe / H. Buerstmayr, M. Lemmens, U. Scholz, P. Ruckenbauer // Annual Wheat Newsletter. – 2000. – №48. – P. 31–32.

6. Корзуненко О.Ф. Видова та токсикологічна характеристика мікроміцетів, виділених із кормів для птиці / О.Ф. Корзуненко, О.М. Васянович, А.Ф. Ображей // Ветеринарна медицина. – 2004. – №3. – С. 20–22.

7. Bai G. Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight / G. Bai, G. Shaner // Annual Review Phytopathology – 2004. – № 42. – P. 135–161.

8. Кривцов В. Фузариозы и фузариотоксикозы / В. Кривцов // Птицеводство. – 1999. – №5. – С. 39–40.

9. Васянович О.М. Ураження зернових кормів мікроскопічними пліснявими грибами на території України / О.М. Васянович, М.Є. Руда, Ю.А. Янголь // Ветеринарна біотехнологія. – 2016. – №29. – С. 62–67.

10. Методика визначення фумонізинів B_1, B_2 в кормах методом тонкошарової хроматографії / Васянович О.М., Сапсай І.С., Янголь Ю.А. – Київ, 2014. – 10 с.

ИЗУЧЕНИЕ БИОСИНТЕЗА ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM MONILIFORME SHELDON*, ЯВЛЯЮЩИЕСЯ ПРОДУЦЕНТАМИ МИКОТОКСИНОВ-ФУМОНИЗИНОВ / Васянович О.Н., Рудая М.Е., Сапейко В.П., Янголь Ю.А., Брезвин О.М.

В статье представлены результаты исследований по изучению наиболее оптимальных параметров биосинтеза микотоксинов-фумонизинов грибом рода Fusarium moniliforme на зерновом субстрате зерна кукурузы, пшеницы и риса. Установлено, что наиболее интенсивный биосинтез токсина проходил на зерне кукурузы у штамма F. moniliforme № 168 и составлял 220 мг фумонизина на кг исследованного субстрата при влажности 70%. На пшенице наилучшим продуцентом был штамм F. moniliforme № 298, который продуцировал 120 мг фумонизина на кг исследованной культуры. На зерновом субстрате риса накопление микотоксина относительно других субстратов было не значительным и составляло от 25 до 90 мг/кг культуры.

Ключевые слова: *микромицеты, культура гриба, фумонизины, микотоксины, микотоксикологические исследования.*

STUDY OF BIOSYNTESIS OF *FUSARIUM MONILIFORME SHELDON* THAT ABLE TO PRODUCE FUMONISINS / Vasjanovych O.M., Ruda M.E., Sapeyko V.P., Jangol Ju.A., Brezvyn O.M.

Introduction. *Fumonisins are a group of mycotoxins produced by Fusarium verticilliodes, Fusarium proliferatum and Fusarium moniliforme.*

These mycotoxins are mainly contaminate corn, thus they are able to accumulate in animal feeds. Fumonisin B1 is toxic to the liver, kidneys and cardiovascular system of all types of animals.

The goal of the work. *To study biosynthesis of Fusarium moniliforme Sheldon that can produce fumonisins.*

Materials and methods of the research. *In our research we used fungy Fusarium moniliforme Sheldon that was cultivated on wheat, rice and corn grains at different temperatures, humidity and terms of cultivation.*

To study the ability of fungi to produce fumonisins, we used "Method for determining fumonisins B1, B2 in feed by thin layer chromatography". The samples were incubated at the temperature of 24 °C for 14 days in a thermostat and for 14 days in a refrigerator at a temperature of 4°C.

Results of the study and discussion*. It was found that the intensity of accumulation of fumonisin depends on the toxicity of the fungus-producer and was found that among the 10 studied, the most active was strain F. moniliforme # 168.*

Experiments have shown that fungus F. moniliforme accumulated fumonisins on different investigated cereal substrates in different ways.

Conclusions and prospects for further research. *The most intensive biosynthesis of the toxin occurred at the moisture content of the substrate – 70%.*

It was detected that the most intensive biosynthesis of toxin produced with F. moniliforme # 168 observed on corn and was equal to 220 mg/kg. The strain F. moniliforme # 298, which produced 120 mg of fumonisin per kg when cultivated on wheat and was the best producer. On the rice grain substrate, toxins biosynthesis was poor compared to other investigated substrates, and ranged from 25 to 90 mg/kg. Strain Fusarium moniliforme # 298 cultivated on wheat showed the highest level of toxin accumulation which was 120 mg/kg.

In future work, the culture of the fungus will be cultivated to produce a standard of fumonisin B1.

Keywords*: micromicytes, fumonisins, mycotoxins, mycotoxicology researches.*

REFERENCES

1. Tremasov, M.Ja. (2000). Izuchenie toksikogeneza *F. sporotrichiella* pri povyshennoj temperature kul'tivirovanija [A study of the toxicogenesis of *F. sporotrichiella* at an elevated temperature of cultivation]. Mikologija i fitopatologija – *Mycology and fitopatology*, *34, 59-62* [in Russian].

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

3. Petenko, A.I. (2006). Obespechenie biologicheskoj bezopasnosti kormov [Provision of biosafety of feeds]. *Veterinarija – Veterinary,* 7, 7-11 [in Russian].

4. Ivanov, A.V. (2008). *Mikotoksikozy zhivotnyh (jetiologija, diagnostika, lechenie, profilaktika)* [*Mycotoxicosis of animals: ethiology, diagnosis, treatment, prevention*]. Moscow: Kolos [in Russian].

5. Buerstmayr, H. Lemmens, M. Scholz, U., & Ruckenbauer, P. (2000). Novel tools for developing *Fusarium* resistant wheat for Europe. *Annual Wheat Newsletter,* 48, 31–32.

6. Korzunenko, O.F., Vasjanovich, O.M., & Obrazhej, A.F. (2004). Vydova ta toksykologichna harakterystyka mikromicetiv, vydilenyh iz kormiv dlja ptyci [Species and toxicological characteristics of micromycetes isolated from feed for poultry]. *Veterinarna medicina Ukrai'ny – Veterinary Medicine of Ukraine,* 3, 20-22 [in Ukrainian].

7. Bai, G., & Shaner, G. (2004). Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight. *Annual Review Phytopathology,* 42, 135-161.

8. Krivcov, V. (1999). *Fuzariozy i fuzariotoksikozy* [Fusarioses and fusariotoxicoses]. Pticevodstvo – *Poultry farming,* 5, 39-40 [in Russian].

9. Vasjanovich, O.M., Ruda, M.E., & Yangol,Y.A. (2016). Urazhennja zernovyh kormiv mikroskopichnymy plisnjavymy grybamy na terytorii' Ukrai'ny [Grain contamination by microscopic fungi in Ukraine]. *Veterinarna biotechnologija – Veterinary Biotechnology,* 29, 62-67 [in Ukrainian].

10. Vasjanovych, O.M. & Sapsai, I.S. (2014). *Metodyka vyznachennja fumonizyniv V1, V2 v kormah metodom tonkosharovoi' hromatografii' [Method of determination of fumonisins B1, B2 in feed by the method of thin-layer chromatography].* Kiev [in Ukrainian].

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: rudaspass@gmail.com,
САПЕЙКО В.П., канд. вет. наук, пров.наук. сп., e-mail: v.sapeyko@gmail.com,
ЯНГОЛЬ Ю.А.*, e-mail: juliajangol@gmail.com
Інститут ветеринарної медицини НААН
НЕЧИПОРЕНКО О.Л., канд. вет. наук, доц., e-mail: f-vet@sau.sumy.ua
Сумський національний аграрний університет

ЗДАТНІСТЬ ГРИБІВ РОДУ FUSARIUM ПРОДУКУВАТИ Т-2 ТОКСИН

У статті висвітлені результати мікотоксикологічних досліджень кормів, визначення видового складу мікроскопічних грибів, а також вивчення токсичних властивостей польових ізолятів штамів грибів роду Fusarium відносно тест-об'єкту Тетрахімени піріформіс. Проведені дослідження виділених штамів на наявність мікотоксинів. Доведено, що токсичні штами є потенційними продуцентами мікотоксинів. Найбільш активними продуцентами виявились штами грибів роду Fusarium виду sporotrichiella. Вивчено здатність штаму Fusarium sporotrichiella var.poae №407/4 продукувати токсин Т-2 у кількості 470 мг/кг культурального середовища.

Ключові слова: *штами, культура грибів, Т-2 токсин, Тетрахімена піріформіс.*

Вступ. Вивчення і поширення грибів роду *Fusarium* у кормах із різних областей України та в різні періоди року має велике значення. Тільки за наявності даних про поширення тих чи інших грибів-продуцентів мікотоксинів у кормах певної географічної зони і знання умов їхнього токсиноутворення можна правильно планувати профілактику окремих мікотоксикозів. Особливо це стосується сільськогосподарських підприємств, де годують тварин кормами власного виробництва [1].

Токсичність, що розвивається на кормах грибів - сапрофітів, зумовлена утворенням і виділенням органічних кислот, ефірних масел, ліпопротеїдів, пігментів та інших речовин, які мають високий ступінь токсичності для людини і сільськогосподарських тварин. Токсиноутворення та умови нагромадження токсичних речовин для більшості грибів вивчені недостатньо. Загальновідомо,

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