

4. Godfroid, J., Saegerman, C., Wellemans, V., et al. (2002). How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Veterinary microbiology*, 90, 461-477.
5. Nielsen, K., Smith, P., Yu, W., et al. (2006). Serological discrimination by indirect enzyme immunoassay between the antibody response to *Brucella* sp. and *Yersinia enterocolitica* O:9 in cattle and pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*, 109, 69-78.
6. Wright, P.F., Tounkara, K., Lelenta, M., et al. (1997). International reference Standards: antibody standards for the indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Revue scientifique et technique*, 3, 824-832.
7. Chessum, B.S., & Denmark, J.R. (1978). Inconstant ELISA. *Lancet*, Vol. 1, 161.
8. Kricka, L.J., Carter, T.J.N., Burt, S.M., et al. (1980). Variability in the adsorption properties of microtiter plates used as solid supports in enzyme immunoassay. *Clin. Chem.*, V. 26, 741-744.

УДК 639:615.9:639.085

DOI: 10.31073/vet\_biotech36-19

ЯНГОЛЬ Ю.А., e-mail: 2019yangol@gmail.com

Інститут ветеринарної медицини НААН

## ДОСЛІДЖЕННЯ КОНТАМІНАЦІЇ КОРМІВ МІКРОСКОПІЧНИМИ ПЛІСНЯВИМИ ГРИБАМИ ТА ЇХ МІКОТОКСИНАМИ

Проведено мікотоксикологічні дослідження зразків кормів з господарства Київської області. Всього ідентифіковано 128 зразків корму. Шляхом дослідження на тест-об'єкті *Tetrachium piriformis* встановлено 64 токсичних штамів. Найбільше активних штамів було встановлено серед грибів роду *Fusarium* – T-2 токсин продукувало 57%, зеараленон – 21%, та *Aspergillus* – найбільше продукували афлатоксин В1 – 54%. Найбільшу кількість мікотоксинів виявляли в кукурудзі та комбікормах, майже всі досліджувані проби кормів містили по декілька мікотоксинів одночасно.

**Ключові слова:** мікотоксини, гриби, корми, моніторинг, штами, фузарії.

**Вступ.** Мікотоксини – метаболіти повсюдно розповсюджених мікроскопічних (плісневих) грибів, які за ступенем ризику для здоров'я тварин та людини займають одне з перших місць серед відомих забруднювачів кормів, продовольчої сировини та продуктів харчування [1].

У сільському господарстві, в тому числі в тваринництві, значні втрати пов'язані з ураженням кормів мікроскопічними пліснявими грибами, адаптованими до певних умов біоценозу, що розрізняються за біологічними властивостями. Багато видів цих грибів можуть утворювати високотоксичні вторинні метаболіти – мікотоксини, які здатні викликати інтоксикації у всіх видів сільськогосподарських тварин та птиці. Мікотоксини накопичуються в

рослинах в процесі вегетації, що робить зерно токсичним і непридатним для виготовлення кормів вже на момент збору урожаю. При зберіганні зерна з підвищеною вологістю (більше 16%) також відбувається значне накопичення мікотоксинів. Одночасне накопичення декількох мікотоксинів може викликати набагато сильніші отруєння порівняно з окремими мікотоксинами [2].

Токсигенні плісняві гриби та їх метаболіти (мікотоксини), уражуючи корми, викликають у тварин та птиці комплексні отруєння різного ступеня важкості – від гострих до хронічних. При цьому відмічають зниження природної резистентності та імунного статусу і, як правило, підвищення захворювань інфекційної та незаразної етіології, в результаті отримуємо зменшення продуктивності, погіршення санітарної якості продукції [3].

Окремі види і популяції мікроскопічних грибів при одночасному ураження зерна злакових культур можуть змінювати характер вегетативного розвитку та рівень біосинтезу мікотоксинів. Тому деякі автори рекомендують систематично проводити мікологічний аналіз зерна [4].

**Метою** нашої **роботи** було вивчення заспореності мікроскопічними пліснявими грибами та мікотоксинами кормів в господарстві Київської області, встановлення видової приналежності виділених грибів та здатності їх продукувати мікотоксини.

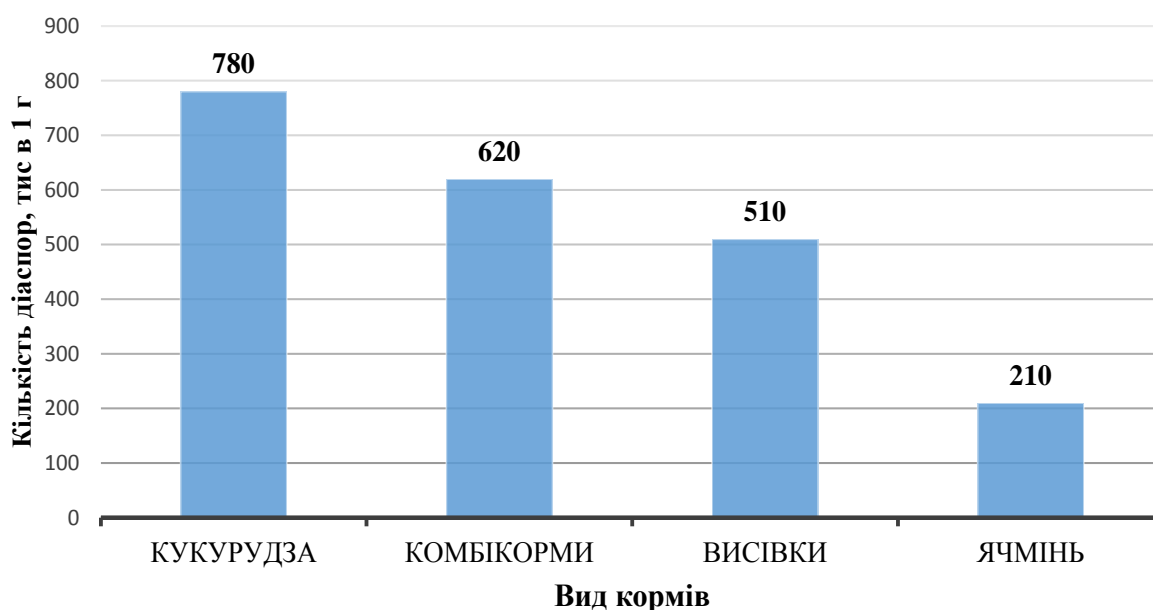
**Матеріали та методи досліджень.** У роботі використовували корми, що надходили з господарства Київської області. За 2019 рік було досліджено 128 проб пшениці, кукурудзи, висівок пшеничних, ячменю, шроту соняшникового, комбікорми. Зразки надходили від початку збору врожаю та в період його зберігання. 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 7й день культивування. Вміст діаспор розраховували за І.П. Ашмариним та А.А. Воробйовим [5]. 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 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].

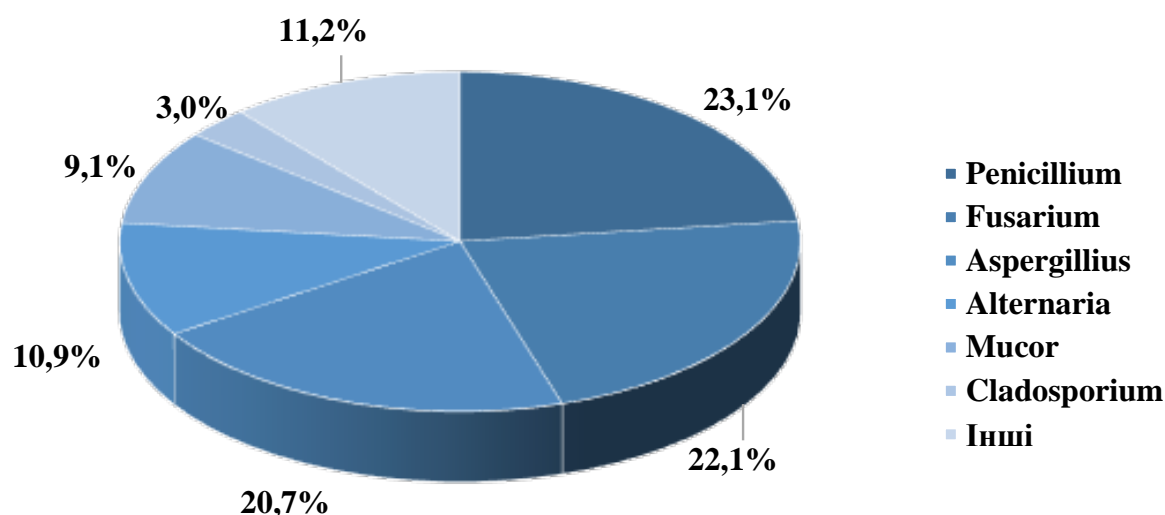
**Результати досліджень та їх обговорення.** Проводячи дослідження на загальну заспorenість кормів мікроміцетами було встановлено перевищення граничних значень кількості діаспор в 1 г корму всіх дослідних зразків. Найбільш засміченими були кукурудза – 780 тисяч діаспор в 1 г корму, комбікорми – 620, висівки – 510, а найменше ячмінь – 210 тисяч діаспор в 1 г корму (рис. 1).



**Рис. 1. Кількість діаспор в 1 г корму.**

У процесі зберігання та використання кормів видовий склад і кількісне накопичення грибів змінюється – зростає кількість грибів родів *Fusarium* і *Penicillium* («плісенні зберігання»).

При мікотоксикологічному дослідженні зразків кормів було ізольовано та ідентифіковано 92 штами грибів, з них 64 токсичних, серед яких гриби роду *Penicillium* (23,1%), *Fusarium* (22,1%), *Aspergillus* (20,7%), *Alternaria* (10,9%), *Mucor* (9,1%), *Cladosporium* (3%) та інші (11,2%) (рис. 2).



**Рис. 2. Співвідношення виявленої мікобіоти кормів.**

Токсичні властивості ізолюваних штамів мікроміцетів вивчали шляхом дії культуральних рідин на тест мікроорганізм *Tetrachimena piriformis* за експрес-методом, розробленим в лабораторії.

Із тривалістю зберігання кормів збільшується токсигенна активність мікроміцетів кормів, особливо за порушення умов зберігання. У таких випадках відбувається накопичення мікотоксинів, що призводить до отруєнь тварин під час годівлі. Тому наступним дослідом було виявлення токсиноутворюючих штамів грибів.

Встановлено, що найбільше активних штамів було серед грибів роду *Fusarium* – Т-2 токсин продукувало – 57%, зеараленон – 21%, а гриби роду *Aspergillus* найбільше продукували афлатоксин В1 – 54% (табл. 1).

*Таблиця 1*

#### **Результати вивчення токсиноутворення мікроміцетів**

Назва штаму	Кількість токсичних штамів	Токсини			
		Афлатоксин В <sub>1</sub>	Зеараленон	Патулін	Т-2 токсин
<i>Penicillium</i>	6	1	–	2	–
<i>Aspergillus</i>	11	6	–	–	–
<i>Fusarium</i>	14	–	3	–	8
<b>Всього</b>	<b>31</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>8</b>

Встановлено, що найбільшу кількість мікотоксинів виявляли в кукурудзі та комбікормах, майже всі досліджувані проби кормів містили по декілька мікотоксинів одночасно (табл. 2).

Таблиця 2

**Мікотоксини виявлені в дослідних зразках кормів**

Вид корму	Досліджено проб	Кількість зразків			
		Афлатоксин В <sub>1</sub>	Зеараленон	Патулін	Т-2 токсин
Пшениця	4	–	1	1	2
Кукурудза	27	12	3	3	9
Висівки пшеничні	7	1	1	–	5
Ячмінь	6	–	1	1	4
Шрот соняшниковий	3	–	–	–	3
Комбікорми	17	1	2	–	14
<b>Всього</b>	<b>64</b>	<b>14</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>37</b>

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** Досліджено 128 проб зерна з господарства Київської області. За видовим складом ізольовані штами грибів розподілилися відповідно: *Penicillium* – 23,1%, *Fusarium* – 22,1%, *Aspergillus* – 20,7%, *Alternaria* – 10,9%, *Mucor* – 9,1%, *Cladosporium* – 3% та інші – 11,2%. Ізольовані штами грибів роду *Fusarium* одночасно продукували Т-2 токсин – 57% і зеараленон – 21%, а гриби роду *Aspergillus* продукували афлатоксин В<sub>1</sub> – 54%.

Під час дослідження найбільшу кількість мікотоксинів виявляли в кукурудзі та комбікормах, майже всі досліджувані проби кормів містили по декілька мікотоксинів одночасно. Слід пам'ятати, що мікотоксини мають синергічну дію, тому нами було надано рекомендації щодо можливості згодовування таких кормів тваринам. Токсикологічний контроль кормових продуктів своєчасно попереджає можливі порушення обміну речовин у тварин зниження продуктивності. Проведення токсикологічного контролю кормів дає змогу захистити тварин від отруєння і зменшити шкідливий вплив токсичних речовин на тварин.

Токсичні штами, які є продуцентами мікотоксинів, будуть депонуватись для використання у виготовленні мікотоксинів.

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Хмельницький Г.О. Обґрунтування системи контролю кормів за вмістом Т-2 токсину / Г.О. Хмельницький, В.Б. Духницький, Г.В. Бойко // Тези доповідей конференції проф.-викл. складу і аспірантів навчально-наукового інституту ветеринарної медицини, якості і безпеки продукції АПК. – 2004. – С. 112–113.
2. 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. – №4. – С. 27–30.

3. Болтянская Э.В. Изучение распространённости токсигенных штаммов грибов рода *Fusarium* и факторов, влияющих на их токсинообразование / Э.В. Болтянская, М.Б. Куваева, Е.А. Кроякова // Сб. науч. тр. Ин-т питания АМН СССР. – 1989. – Т. 9. – С. 256–262.
4. Буряк В.Н. Микотоксикозы свиней и их профилактика / В.Н. Буряк // Зоотехния. – 2007. – № 9. – С. 29–31.
5. Апатенко В. Небезпечні мікотоксини / В. Апатенко // Агробізнес сьогодні. – 2011. – № 1/2. – С. 18–20.
6. Ашмарин И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. – Львов: 1962. – 180 с.
7. Саттон Д. Определитель патогенных и условно патогенных грибов / Д. Саттон, А. Фотергил, М. Ринальди. – Москва: Мир, 2001. – 467 с.
8. Скринінг-метод одночасного виявлення афлатоксину В<sub>1</sub>, патуліну, стеригматоцистину, Т-2 токсину, зеараленону та вомітоксину в різних кормах: метод. рек. – Затв. Держдепартамент вет. мед. Мін. АПК України 09.04.1996 р.
9. Малінін О. Мікотоксикологічний моніторинг концентрованих кормів Лісостепу України / О. Малінін, О. Куцан, Г. Шевцова // Тваринництво України. – 2003. – №12. – С. 26–28.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ КОНТАМИНАЦИИ КОРМОВ МИКРОСКОПИЧЕСКИМИ ПЛЕСНЕВЫМИ ГРИБАМИ И ИХ МИКОТОКСИНАМИ / Янголь Ю.А.

*Проведено микотоксикологические исследования 128 образцов кормов из хозяйства Киевской области. Путем исследования на тест-объекте *Tetrachimena piriformis* установлено 64 токсичных штаммов. Больше всего активных штаммов было установлено среди грибов рода *Fusarium* – Т-2 токсин производило 57%, зеараленон – 21%, и *Aspergillus* – афлатоксин В<sub>1</sub> – 54%. Наибольшее количество микотоксинов проявляли в кукурузе и комбикормах, почти все исследуемые пробы кормов содержали по несколько микотоксинов одновременно.*

**Ключевые слова:** грибы, микотоксины, корма, мониторинг, штаммы, фузариоз.

#### STUDY OF FUNGI FEED CONTAMINATION AND THEIR MYCOTOXINS / Yanhol Yu.A.

**Introduction.** *Mycotoxins are metabolites of widespread microscopic fungi, which are one of the leading contaminants of feed and food in terms of risk to animal and human health.*

**The goal of the work** *was to study the level of feed grain contamination with microscopic mold fungi and mycotoxins in one farm in Kyiv oblast, to determine species belonging of fungi isolates and their ability to produce mycotoxins.*

**Materials and methods.** *For the study we used feeds received from the farm in Kyiv oblast. In 2019, 128 feed samples were tested from the beginning of the harvest and during its storage. To determine feed general contamination by micromycetes we used conventional mycological methods. The toxigenic properties of isolated micromycetes were studied by the effect of their culture fluids on the *Tetrachimena piriformis* test microorganism according to DSTU 3570-97. Toxic strains were tested for the ability to biosynthesize mycotoxins.*

**Results of the study and discussion.** *Mycotoxicological examination of feed resulted in the isolation and identification of 92 fungi strains, 64 of which were toxic ones including fungi of the genus *Penicillium* (23.1%), *Fusarium* (22.1%), *Aspergillus* (20.7%), *Alternaria* (10.9%), and*

*Mucor* (9.1%), *Cladosporium* (3%) and other strains (11.2%). Isolated *Fusarium* strains produced T-2 toxin (57%) and zearalenone (21%). 54% *Aspergillus* fungi strains produced aflatoxin B1.

**Conclusions and prospects of further research.** Study revealed that 64 of 92 strains of fungi isolated from 128 samples of fodder grain were toxic. The most spread strains were *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, and *Mucor*. The most number of toxic fungi were among *Penicillium* strains – 23.1% and *Fusarium* – 22.1%. It was confirmed that *Fusarium* strains produced mostly T-2 toxin – 57% and zearalenone – 21%. *Aspergillus* strains produced mostly aflatoxin B1 – 54%.

The largest amount of mycotoxins was found in corn and mixed feed, almost all of the studied samples contained several mycotoxins simultaneously. In many cases, the rate of mycotoxins did not exceed the maximum permissible level.

**Keywords:** mycotoxins, feed, monitoring, strains, fusaria.

## REFERENCES

1. Khmelnytskyi, H.O., Dukhnytskyi, V.B., & Boiko, H.V. (2004). Obgruntuvannia systemy kontroliu kormiv za vmistom T-2 toksynu [Substantiation of the feed control system for T-2 toxin content]. Proceedings from *Konferentsia prof.-vykl. skladu i aspirantiv navchalno-naukovoho instytutu veterynarnoi medytsyny, yakosti i bezpeky produktsii APK – Conference of academic staff and graduate students of the Educational and Scientific Institute of Veterinary Medicine, Quality and Safety of Agricultural Products*. (pp. 112-113). Kyiv: NULES of Ukraine [in Ukrainian].
2. Vasianovych, O.M., Korzunenko, O.F., Obrazhei, A.F., et al. (2003). Monitorynhovi doslidzhennia mikrobioty kormiv z riznykh rehioniv Ukrainy [Monitoring studies of feed mycobiota from different regions of Ukraine]. *Veterynarna biotekhnolohiia – Veterinary biotechnology*, 4, 27-30 [in Ukrainian].
3. Boltianskaia, E.V., Kuvaeva, M.B., & Kroiakova, E.A. (1989). Izuchenie rasprostranennosti toksigennykh shtammov gribov roda *Fusarium* i faktorov, vliiaushchikh na ikh toksinoobrazovanie [Study of the prevalence of toxigenic strains of fungi of the genus *Fusarium* and factors affecting their toxin production]. *Sbornik nauchnykh trudov In-t pitaniia AMN SSR – Collection of scientific papers of the Institute of Nutrition AMS SSR*, 9, 256-262 [in Russian].
4. Buriak, V.N. (2007). Mikotoksikozy svinei i ikh profilaktika [Pig mycotoxicosis and their prevention]. *Zootekhnika – Animal science*, 9, 29-31 [in Russian].
5. Apatenko, V. (2011). Nebezpechni mikotoksyny [Dangerous mycotoxins]. *Ahrobiznes sohodni – Agribusiness today*, Is. 1/2, 18-20 [in Ukrainian].
6. Ashmarin, I.P., & Vorobev, A.A. (1962). *Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniakh* [Statistical methods in microbiological research]. Lviv [in Ukrainian].
7. Satton, D., Fotergil, A., & Rinaldi, M. (2001). *Opredelitel patogennykh i uslovno patogennykh gribov* [determinant of pathogenic and opportunistic fungi]. Moscow: Mir [in Russian].
8. Skryninh-metod odnochasnoho vyiavlennia aflatoksynu V1, patulinu, steryhmatsystynu, T-2 toksynu, zearalenonu ta vomitoksynu v riznykh kormakh [Screening method for simultaneous detection of aflatoxin B1, patulin, sterigmatocystin, T-2 toxin, zearalenone and vomitoxin in different feeds]. (1996). *Guidelines from 09.04.1996*. Kyiv: Derzhdepartam. vet. med. Min. APK Ukrainy [in Ukrainian].
9. Malinin, O., Kutsan, O., & Shevtsova, H. (2003). Mikotoksykologichnyi monitorynh kontsentrovanykh kormiv Lisostepu Ukrainy [Mycotoxicological monitoring of concentrated feed of the Forest-Steppe of Ukraine]. *Tvarynnystvo Ukrainy – Livestock of Ukraine*, 12, 26-28 [in Ukrainian].