

ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

АНДРІЙЧУК АНДРІЙ ВІТАЛІЙОВИЧ

УДК 619:615.918:633.16:582.28.123.4

**МІКОБІОТА ЗЕРНА ЯЧМЕНЮ, БІОСИНТЕЗ
І БІОЛОГІЧНА ДІЯ ОХРАТОКСИНУ А**

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата ветеринарних наук

Одеса – 2007

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Білоцерківському державному аграрному університеті
Міністерства аграрної політики України

Науковий керівник – Рухляда Валентин Васильович, дійсний член
Нью-йоркської академії наук, доктор ветеринарних
наук, професор, Білоцерківський державний
аграрний університет, завідувач кафедри
мікробіології та вірусології

Офіційні опоненти: **Буряк Євгеній Іванович**, доктор ветеринарних наук,
професор, Одеський державний аграрний університет,
завідувач кафедри мікробіології та вірусології;
Котик Анатолій Миколайович, доктор ветеринарних
наук, головний науковий співробітник лабораторії
мікотоксикології Інституту птахівництва УААН.

Захист дисертації відбудеться “_31_” _____ січня _____ 2008 р. о __11__ год.
на засіданні спеціалізованої вченої ради К 41.372.01 в Одеському державному
аграрному університеті за адресою: 65012 м. Одеса, вул. Пантелеймонівська,
13, навчальний корпус №3, ауд. 309.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Одеського державного
аграрного університету за адресою: 65039 м. Одеса, пер. Матросова, 6.

Автореферат розісланий “_26_” _____ грудня _____ 2007 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

С.І. Масленікова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Про важливість проблеми, пов'язаної з токсичними метаболітами грибів, свідчать повідомлення із різних країн, згідно з якими 25–30 % виробленого у світі зерна щорічно забруднюється мікотоксинами. При цьому найчастіше звертається увага на продукти метаболізму грибів родів *Fusarium*, *Aspergillus* та *Penicillium*, зокрема на афлатоксини, охратоксин А, трихотецени, зеараленон та фумонізиди (Зайченко А.М. и др., 2001; Монастырский О.А., 2000; Папазян Р., 2002; El-Nageraby S., 2001; Pitt J., 2000). Кожного року економіка США від дії мікотоксинів втрачає більше 2 млрд доларів, а для Росії ці збитки становлять в середньому 500 млн рублів. У літературі періодично з'являються повідомлення про випадки мікотоксикозів тварин та птахів у господарствах нашої держави вторинними метаболітами грибів і про розповсюдження токсигенних штамів мікроміцетів у кормах рослинного походження (Ображей А.Ф., 1997; Котик А.Н., 1999; Рухляда В., Малохатко І., 2002).

У багатьох країнах світу проводяться токсикомікологічні дослідження зерна різних злаків, у тому числі ячменю, встановлюється присутність мікотоксинів у зразках та виявляється наявність токсигенних мікроміцетів (Sultana N., Jalaludin M., 1980; Kossim M. Y., 1987; Львова Л.С. и др., 1992; Clear R. et al., 2000). Так, російські мікотоксикологи повідомляють, що в останні роки спостерігається зростання частоти ураження зерна грибами роду *Fusarium*, і паралельно зростає щільність популяцій високотоксигенних штамів (Монастырский О.А., 2001). Тому деякі автори рекомендують систематично проводити мікологічний аналіз зерна (Павлов В.П. и др., 2003; Toursel P., 1998). Вітчизняні фахівці (Харченко С.М. та ін., 1997; Рухляда В., Кулініч М., 1997; Малінін О., 2003) проводили мікологічні дослідження зернових кормів та комбікормів і вивчали також мікобіоту зерна ячменю. Однак, такі дослідження не мали системного характеру і не могли повною мірою висвітлити спектр мікроміцетів, що контамінують зерно цієї культури.

В останні роки значна увага приділяється охратоксину А, що пов'язано з розширенням ареалу розповсюдження грибів-продуцентів цього токсину. Так, Ueno Y. et al. (1991р.) встановили здатність гриба *Aspergillus niger* продукувати охратоксин А, що в подальшому було підтверджено дослідженнями Abarca L. et al. (1994) та Belli N. et al. (2004). Однак, незважаючи на те, що *A. niger* є контамінантом кормів в Україні, відсутні вітчизняні публікації про дослідження штамів цього гриба на здатність продукувати охратоксин А. На сьогодні залишаються недостатньо вивченими деякі питання біосинтезу та біологічної дії охратоксину А і не розроблені засоби патогенетичного лікування та профілактики охратоксикозу тварин та птиці.

Обрана тема дисертаційної роботи та проведені дослідження, що спрямовані на вивчення висвітлених вище питань, є актуальними як в практичному, так і науковому плані.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Виконана робота є частиною планової теми кафедри мікробіології та вірусології Білоцерківського державного аграрного університету “Вивчення ролі мікроскопічних грибів та їх метаболітів у патології сільськогосподарських тварин” (№ держреєстрації 0103U004470).

Мета і завдання дослідження. Мета дисертаційної роботи полягала у вивченні мікобіоти зерна ячменю, вирощеного в Україні, встановленні її токсигенності і видів токсинів, що продукують контамінанти зерна, дослідженні біосинтезу та біологічної дії охратоксину А із встановленням антитоксичної ефективності L-фенілаланіну при охратоксикозі перепелів.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

- вивчити кількісний та якісний склад епіфітної та ендofітної мікобіоти різних сортів зерна ячменю урожаїв 2003 та 2004 рр. різних фізико-географічних регіонів України;

- встановити наявність серед виділених мікроміцетів продуцентів Т-2, F-2 токсинів, дезоксиніваленолу (ДОНу), моніліформіну, охратоксину А, афлатоксинів, пеніцилової, коєвої та аспергілової кислот;

- розробити експресний метод визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати зеараленон;

- експериментально визначити оптимальні умови для отримання максимальної кількості охратоксину (ОТА) при культивуванні штамів *Aspergillus ochraceus* Wilhelm;

- вивчити вплив ОТА на організм білих мишей і перепела японського та встановити антитоксичну ефективність L-фенілаланіну при охратоксикозі перепелів.

Об'єкт дослідження – мікобіота зерна ячменю, біосинтез мікотоксинів, охратоксикоз мишей та перепелів, протективні властивості L-фенілаланіну щодо впливу ОТА.

Предмет дослідження – мікроміцети, мікотоксини, охратоксин А, клінічні, біохімічні, патологоанатомічні та гістологічні показники як критерії оцінки токсичного впливу ОТА та антидотної дії L-фенілаланіну.

Методи дослідження. Мікологічні – визначення кількісного та якісного складу епіфітної та ендofітної мікобіоти зерна ячменю. Мікотоксикологічні, хіміко-токсикологічні та хроматографічні – дослідження токсигенних властивостей мікроміцетів та детекції синтезованих ними токсинів. Клінічні, біохімічні – концентрація сечовини та активність АСТ, АЛТ, ЛДГ_{заг}, ЛДГ₁ у сироватці крові. Патолого-анатомічні та гістологічні – вивчення характеру морфологічних змін в організмі тварин при мікотоксикозах. Математично-статистичний метод застосовувався для опрацювання отриманих експериментальних даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше в Україні встановлений кількісний та якісний склад епіфітної та ендofітної мікобіоти зерна ячменю та вивчена токсигенність виділених грибів родів *Aspergillus* та *Fusarium*. Виявлена достовірна різниця у контамінації зерна грибами родів *Fusarium* і *Penicillium*,

отриманого в зоні Полісся, Лісостепу та Степу. При токсикологічному дослідженні штамів *Aspergillus niger* van Tiegh., ізольованих у нашій країні, вперше виявлені продуценти ОТА, а їх розповсюдження потребує подальшого вивчення. Удосконалене поживне середовище для синтезу штамами *A. ochraceus* охратоксину А та метод його екстракції, що дозволяє вилучати токсин з субстрату у максимальній кількості. Вивчено перебіг охратоксикозу перепела японського та встановлена антидотна дія L-фенілаланіну щодо впливу ОТА. Розроблений експресний метод визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати зеараленон, на який отримано деклараційний патент на корисну модель № u 200508728 від 15.02.2006 “Спосіб експресного визначення здатності грибів *Fusarium spp.* продукувати зеараленон”.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблений спосіб експресного визначення здатності грибів *Fusarium spp.* продукувати зеараленон дозволяє термін дослідження токсигенності фузаріїв скоротити з чотирьох тижнів до двох, що є дуже важливим для профілактики та своєчасної діагностики зеараленонтоксикозу сільськогосподарських тварин.

Одержані результати щодо видового і кількісного складу мікобіоти зерна ячменю різних фізико-географічних регіонів України та токсичних властивостей виділених грибів родів *Aspergillus* та *Fusarium* необхідні для об'єктивної оцінки якості зернової продукції. Отримані дані про особливості поширення токсигенних грибів на досліджуваному матеріалі полегшать профілактику і діагностику мікотоксикозів людей та тварин, забезпечать розробку держстандартів, методичних вказівок, рекомендацій щодо виявлення тих мікотоксинів, продуценти яких найчастіше зустрічаються в зерні ячменю.

Прикладне та наукове значення має виявлення продуцентів ОТА серед мікроміцетів зерна ячменю, оскільки максимально допустимі рівні цього мікотоксину в зерновій продукції вітчизняними нормативними документами не регламентовані та не обґрунтовані науково. Отримані клінічні, біохімічні, патологоанатомічні та гістологічні показники при охратоксикозі перепелів можуть бути використані для діагностики цього захворювання, а також висвітлюють маловідомі сторони біологічної дії ОТА на організм перепела японського. Виявлення протективних властивостей L-фенілаланіну при охратоксикозі перепелів після більш глибокого вивчення дозволить застосовувати цю речовину для лікування та профілактики отруєнь охратоксином не тільки птиці, а й ссавців.

Отримані результати досліджень застосовуються в навчальному процесі для підготовки фахівців ветеринарної медицини у Білоцерківському державному аграрному університеті, Київському національному аграрному університеті та у наукових дослідженнях ветеринарних і токсикологічних лабораторій.

Особистий внесок дисертанта. Особистий внесок здобувача полягає у вивченні і аналізі вітчизняних та іноземних літературних джерел щодо теми дисе-

ртаційної роботи, розробці планів та схем експериментальних досліджень, їх організації і виконанні, статистичній обробці одержаних результатів, їх аналізі, узагальненні, формулюванні висновків та практичних рекомендацій.

Видова ідентифікація деяких мікроміцетів проводилась у відділі фізіології і систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України спільно з кандидатом біологічних наук О.В. Соколовою. Біохімічні дослідження сироватки крові проводились спільно з аспірантами кафедри терапії та клінічної діагностики Білоцерківського ДАУ П.В. Шарандаком та А.Ю. Мельником; завідувач академік УААН, доктор ветеринарних наук професор В.І. Левченко.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації доповідались на I Міжнародній науково-практичній конференції “Екотрофология. Современные проблемы” (Біла Церква, 2005), IV і V державних науково-практичних конференціях аспірантів і докторантів “Наукові пошуки молоді у третьому тисячолітті” (м. Біла Церква, 2005, 2006 рр.), міжнародній науково-практичній конференції “Наукові та практичні аспекти ветеринарної медицини в Україні” (Білоцерківський ДАУ, м. Біла Церква, 2006), науково-практичній конференції “Сучасні проблеми ветеринарної фармакології, токсикології і фармації” (УААН НАУ, м. Київ, 2006).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 6 наукових статей у фахових виданнях, а саме 2 статті у журналі “Ветеринарна медицина України” (2005, 2006), 2 статті у “Віснику Білоцерківського ДАУ” (2006, 2007), одна у “Віснику аграрної науки” (2007), одна у “Науковому віснику НАУ” (2007р.), а також 2 тези доповідей.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, загальної методики та основних методів дослідження, результатів досліджень та їх обговорення, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел і додатків. Робота містить 6 розділів, викладена на 124 сторінках комп’ютерного набору, містить 16 таблиць і 18 рисунків. Список літератури включає 228 джерел, з яких 138 іноземних авторів.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційна робота виконувалась протягом 2003–2006 рр. у науково-дослідній лабораторії кафедри мікробіології та вірусології Білоцерківського державного аграрного університету. Під час проведення видової ідентифікації деяких грибів консультативну допомогу отримували у відділі фізіології і систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України у кандидата біологічних наук О.В. Соколової. Підтвердження кількісного визначення вмісту охратоксину А у субстратах з метою постановки експериментального охратоксикозу перепела японського виконувались у відділі

хіміко-токсикології і радіології Київської міської державної лабораторії ветеринарної медицини, який акредитований у системі ISO 17025 DAP.

Об'єктом досліджень були 100 зразків зерна ячменю урожаю 2003 та 2004 рр., відібрані у трьох фізико-географічних регіонах країни в період зберігання. У зоні Полісся зерно відбирали у Чернігівській та Сумській областях, у лісостеповій зоні – у Київській, Вінницькій і Черкаській областях та у степовій зоні – у Запорізькій області і АР Крим. Проведено також дослідження 2-х зразків зерна з Донецької та Черкаської областей, згодуювання якого сільськогосподарським тваринам викликало захворювання на мікотоксикози.

Зразки для досліджень відбирались у сільськогосподарських та зернопереробних підприємствах, а також у обласних і районних насінневих інспекціях. Відбір зерна для мікологічного дослідження проводили, керуючись методичними вказівками із санітарно-мікологічної оцінки і поліпшення якості кормів відповідно до ГОСТ 13586, 3-83 та ДСТУ 3570–97.

Епіфітну мікофлору виявляли методом прямої інокуляції, для чого по 10 зерен розміщали по поверхні середовища Чапека у чашках Петрі. Для виділення ендоефітної мікобіоти зерно перед посівом обробляли 3%-ним розчином формаліну протягом трьох хвилин, а потім промивали стерильною водою, до якої додавали 5%-ний розчин аміаку. Посіви культивували в термостатах при 24 та 37 °С протягом 7-ми діб.

Для встановлення ступеня контамінації матеріалу мікроміцетами (кількість колонієутворювальних одиниць в 1 г зерна) застосовували метод серійних розведень. Для цього наважку подрібненого зерна масою 10 г заливали стерильною водою до 100 мл та струщували протягом 20 хвилин. Після цього готували послідовні розведення 1:100, 1:1000 та 1:10000, вносили по 1 мл на поверхню середовища Чапека, висіваючи суспензії з розрахунку одне розведення на дві чашки Петрі. Інкубацію проводили при 24 та 37 °С, і колонії підраховували на 3–5-й дні після посіву. Вміст колонієутворювальних одиниць у 1г зерна вираховували за формулами [5].

З метою отримання чистих культур гриби родів *Aspergillus* і *Penicillium* висівали на скошене середовище Чапека, а *Fusarium spp.* – на сусло-агар. Ідентифікацію виділених штамів до видів і різновидів проводили з використанням загальноприйнятих визначників. У разі ізоляції штамів фузаріїв, які не утворювали конідій, для їх ідентифікації використовували метод мікрокультури (Билай В.И., Элланская И.А., 1975). Розміри конідій, міцелію та інших елементів грибів встановлювали мікроскопією роздавленої краплі з використанням окуляр-мікромметра.

Визначення токсичності 67 ізолятів *Fusarium spp.* проводили з застосуванням мікробіологічного методу, суть якого полягає у пригніченні росту чутливого до трихотеценових мікотоксинів тест-мікроорганізму *Candida pseudotropicalis* шт. 44 ПК (Рухляда В.В., Башмакова Е.В., 1988). При цьому для встановлення токсич-

ності колоній фузаріїв, що вирости в первинних посівах зерна або були вирощені у чистих культурах в чашках Петрі, використовували метод агарових блоків.

22 штами фузаріїв досліджували на здатність продукувати Т-2, F-2 токсини, ДОН та моніліформін, для чого їх культивували на 10 г стерильного, зволоженого зерна ячменю у колбах об'ємом 100 мл. Кількісний вміст Т-2 токсину в екстрактах з культур грибів визначали модифікованим методом тонкошарової хроматографії з біоавтографією (Рухляда В.В., 1998).

З метою визначення наявності дезоксиніваленолу в екстрактах з культур грибів застосовували метод тонкошарової хроматографії (ТШХ), для чого на стартову лінію пластини для хроматографії *Sorbfil* за допомогою мікрошприца наносили екстракти і паралельно – стандартний розчин ДОНу. Після розподілу в системі розчинників гексан–ацетон (3:2) пластини просушували, обробляли 10 %-ним розчином алюмінію хлориду в етанолі, прогрівали в сушильній шафі протягом 5 хв при 105 °С, після чого ДОН виявлявся в УФ-промінні у вигляді плям із синьою флуоресценцією з R_f 0,35–0,40 (Жбураєв В.І., 1990).

Для детекції моніліформіну екстракти наносили на пластини *Sorbfil* і хроматографували в системі толуол – ацетон – метанол (5:3:2), токсин проявлявся в УФ-світлі з довжиною хвилі 254 нм у вигляді плям поглинання з R_f 0,27. Наявність моніліформіну підтверджували обробкою хроматограм розчином 2,4-динітрофенілгідразину в соляній кислоті з наступним прогріванням їх протягом 10 хв при температурі 110 °С. Після цього токсин проявлявся у видимому світлі плямами червоно-коричневого кольору (Rabie L. et al, 1978).

Зеараленон на хроматограмах виявляли в УФ-променях з довжиною хвилі 365 нм. На хроматограмі з'ясовували наявність речовини з R_f і характером світіння, аналогічним стандарту зеараленону, який проявлявся в ультрафіолеті у вигляді плями з блакитною флуоресценцією і R_f 0,64 \pm 0,05. Присутність токсину підтверджували шляхом обробки хроматограм 20%-ним розчином сірчаної кислоти в метанолі з наступним прогріванням у сушильній шафі протягом 5 хв при температурі 120 °С, після чого токсин проявлявся у вигляді плям жовтоцегляного кольору (Ображей А.Ф. та ін., 1998).

У процесі розробки експресного способу визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати зеараленон використовували 6 штамів фузаріїв різної активності (*F.culmorum*, *F.graminearum*, *F.sporotrichiella* var. *poae*), здатність яких продукувати зеараленон була встановлена раніше традиційним методом.

Фузарії культивували на сусло-агарі, сусло-агарі із глютаміновою кислотою (10 г/л), середовищі Чапека, середовищі Чапека із глютаміновою кислотою (10 г/л), середовищі Чапека із пептоном (10 г/л), середовищі Чапека із дріжджовим екстрактом (5 г/л), середовищі Чапека із пептоном (10 г/л) і дріжджовим екстрактом (5 г/л) та середовищі, до складу якого входили 100 мл води, 2 г желатину, 0,8 г глютамінової кислоти, 2 г крохмалю, 1 г глюкози, 0,2 г нітрату натрію,

0,1 г однозаміщеного калію фосфату, 0,05 г магнію сульфату, 0,05 г калію хлориду, 0,001 г заліза сульфату. Фузарії культивували в 50 мл пробірках на 15 мл скошеного середовища.

Для встановлення оптимального терміну культивування фузарії вирощували при трьох варіантах температурних режимів: перший – 12 діб при $t^{\circ} 24^{\circ} \text{C}$ та 3 доби при 4°C , другий – 8 діб при $t^{\circ} 24^{\circ} \text{C}$ та 4 доби при $t^{\circ} 4^{\circ} \text{C}$ і 7 діб – 24°C та третій – 3 доби при $t^{\circ} 4^{\circ} \text{C}$ і токсин виявляли методом ТШХ.

Здатність продукувати охратоксин А, коєву, пеніцилову, аспергілову кислоти і афлатоксин встановлювали у 15 ізолятів роду *Aspergillus*. Охратоксинутворювальні властивості досліджували у штамів *A. niger* та *A. ochraceus*, для чого їх культивували на зернових субстратах, а токсин виявляли методом ТШХ та високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Для вивчення здатності продукувати коєву, пеніцилову і аспергілову кислоти та афлатоксин, гриби культивували на цукрово-дріжджовому середовищі, і наявність токсинів встановлювали методом ТШХ (Львова Л.С. и др., 1978). Аспергілову кислоту виявляли в культуральній рідині, яка під час взаємодії зі спиртовим розчином хлориду феруму забарвлювалась у червоний колір, а з мідним купоросом – в зелений. Стандарти Т-2 і F-2 токсинів були надані науковим керівником, професором В.В. Рухлядою, ДОНу – доктором ветеринарних наук А.М. Котиком. Охратоксин А застосовували російського виробництва (ГСО 7941-2001), а решта мікотоксинів були люб'язно надані Київською міською державною лабораторією ветеринарної медицини.

З метою підтвердження здатності штамів *A. niger* продукувати ОТА встановлювали характер дії їх екстрактів шляхом внутрішньочеревного введення трьом білим мишам у дозі 0,3 мл з подальшим проведенням гістологічних досліджень печінки та нирок загиблих тварин, порівнюючи з описаними змінами у мишей при експериментальному охратоксикозі А.

З метою вивчення впливу охратоксину на організм перепела японського та дослідження антитоксичних властивостей L-фенілаланіну, в дослідах використали 24 п'ятитижневих перепелів масою 180 г, з яких було сформовано три групи-аналоги по 8 голів у кожній. Птахи першої групи отримували ОТА внутрішньо в дозі 5 мг/кг протягом 14 діб, другої – L-фенілаланін у кількості 550 мг/кг та ОТА, а третя група була контрольною. Охратоксин вводили внутрішньо у 1,4%-ному розчині натрію гідрокарбонату, а L-фенілаланін – у вигляді водного розчину. Перепелів зважували на початку досліду та на 7-й і 14-й дні, в ці ж дні відбирали кров методом декапітації (по чотири птиці кожного разу). У сироватці крові визначали рівень сечовини за діацетилмонооксимним методом, активність загальної лактатдегідрогенази (ЛДГ_{зар}) і кардіоспецифічного ізоферменту – ЛДГ₁ встановлювали методом Севела-Товарека, а аспартат-(АСТ) і аланінамінотрансфераз (АЛТ) – уніфікованим динітрофенілгідразиним методом Райтмана–Френкеля. Окрім того, гістологічно досліджували печінку, нирки і серце.

Біохімічне дослідження сироватки крові дослідних тварин та птиці, інтерпретація результатів проводились спільно із завідувачем кафедри терапії та клінічної діагностики Білоцерківського ДАУ, академіком УААН В.І. Левченком, аспірантами П.В. Шарандаком та А.Ю. Мельником. Гістологічні дослідження проводились за консультативної підтримки співробітників кафедри патанатомії доцентів М.В. Утеченка, І.В. Папченка та М.Є. Іваницького, за що автор висловлює їм щире подяку.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Мікобіота зерна ячменю

Мікологічним дослідженням встановлено, що кількість КУО в одному грамі зерна урожаю 2003 та 2004 рр. по Україні коливалась від $7,5 \times 10^2$ до $2,1 \times 10^4$ і в середньому становила $6,6 \times 10^3 \pm 1,2 \times 10^3$ (табл.1). Більш інтенсивно було контаміноване зерно ячменю у 2003 р., ніж у 2004 р. У зерні зони Степу встановлена найбільша кількість КУО, а у лісостеповій зоні – найменша.

Мікобіота зерна ячменю представлена мікроміцетами 16-ти родів, які віднесені до 27-ми видів та 6-ти різновидів. Протягом двох років домінували гриби родів *Aspergillus* та *Alternaria*, а серед аспергілів переважали види *A. flavus* Lk: Fr. та *A. fumigatus* Fres., причому контамінація зерна ячменю грибом *A. flavus* в АР Крим протягом двох років становила 100%. *A. niger* van Tiegh. протягом двох років був частим контамінантом, а види *A. candidus* Zk:Fr., *A. flavipes* (Bain.et Sart.) Thom. et Church., *A. ochraceus* Wilhelm та *A. terreus* Thom були рідкісними – контамінація ними зерна складала 2–7%.

Таблиця 1

Вміст колонієутворювальних одиниць грибів у 1г зерна ячменю

Фізико-географічні регіони	Вміст КУО			
	2003 р.		2004 р.	
	<i>Lim</i>	<i>M±m</i>	<i>Lim</i>	<i>M±m</i>
Полісся	$\frac{7,5 \times 10^2}{1,5 \times 10^4}$	$8,5 \times 10^3 \pm 2,7 \times 10^3$	$\frac{1,4 \times 10^3}{1,2 \times 10^4}$	$4,7 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$
Лісостеп	$\frac{1,9 \times 10^3}{1,8 \times 10^4}$	$6,8 \times 10^3 \pm 3,2 \times 10^3$	$\frac{1,7 \times 10^3}{2,1 \times 10^4}$	$4,7 \times 10^3 \pm 1,7 \times 10^3$
Степ	$\frac{1,5 \times 10^3}{1,2 \times 10^4}$	$8,5 \times 10^3 \pm 2,3 \times 10^3$	$\frac{1,5 \times 10^3}{1,6 \times 10^4}$	$7,7 \times 10^3 \pm 1,8 \times 10^3$
По країні	$\frac{7,5 \times 10^2}{1,8 \times 10^4}$	$8,0 \times 10^3 \pm 1,5 \times 10^3$	$\frac{1,4 \times 10^3}{2,1 \times 10^4}$	$5,2 \times 10^3 \pm 9,2 \times 10^2$

Частота контамінації *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. у середньому по Україні за два роки складала 89 %, а в Чернігівській, Сумській, Київській та Запорізькій областях сягала 100 %.

Мукоральні гриби виділялись із 88 % досліджених проб і були представлені 4-ма видами, серед яких домінуючим був *Rhizopus oryzae* Went., постійними

контамінантами (зустрічальність від 10 до 30 %) були *Absidia corymbifera* (Cohn) Sacc. et A. Trotter, *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. var. *stolonifer*, а гриб *Absidia spinosa* Lendner var. *spinosa* був рідкісним.

До домінуючих належали гриби родів *Phoma*, *Penicillium* та *Drechslera*, причому гриб *Penicillium glandicola* (Oudem.) Seifert et Samson постійно зустрічався на зерні ячменю. Решта видів пеніциліїв, що не були ідентифіковані до виду, виявляли у 48 % проб.

Гриби роду *Fusarium* контамінували 56 % зразків зерна і були представлені 5-ма видами і 5-ма різновидностями. Види *Fusarium sambucinum* Fuck. та *F. sporotrichiella* Bilai var. *poae* (Peck) Wr. постійно зустрічались на зерні ячменю, а штами *F. Culmorum* (Smith) Sacc., *F. gibbosum* App. et Wr. var. *bullatum* (Sherb.) Bilai, *F. heterosporum* Nees: Fr., *F. moniliforme* Sheld. var. *lactis*, *F. oxysporum* (Schlecht.) Snyder et Hans., *F. semitectum* Berk. et Rav., *F. solani* (Mart.) App. et Wr. var. *argillaceum* (Fr.) Bilai були рідкісними. Гриб *Monascus ruber* van Tiegh. був частим контамінантом і виділявся в 32 % досліджених проб, а всі інші мікроміцети належали до групи рідкісних.

У зерні врожаю 2003 р. частота виділення грибів більшості видів значно вища, ніж у зерні, зібраному в 2004 р., причому у 11-ти видів мікроміцетів різниця була достовірною. У 2003 р. було виділено та ідентифіковано 27 видів та 6 різновидностей мікроміцетів, а в 2004 р. – виявлено лише 18 видів і одна різновидність. Це пояснюється різними гідротермічними умовами у вегетаційний період двох років. Гриби родів *Fusarium* та *Penicillium* найбільш часто контамінували зерно, вирощене на Поліссі, меншою мірою – зерно із Лісостепу і найменше – степової зони, причому різниця у контамінації була вірогідною. Ізоляти роду *Aspergillus*, навпаки, частіше зустрічались у зразках зерна ячменю із південних областей, дещо рідше – із лісостепової зони і найрідше – із Полісся (рис. 1).

Рис. 1. Контамінація грибами зерна ячменю в різних фізико-географічних регіонах країни

Оскільки найнебезпечніші мікотоксини продукують гриби родів *Fusarium* та *Aspergillus*, тому вони були піддані токсикологічному дослідженню.

Вивчення токсигенних властивостей грибів роду *Fusarium*

Токсикологічному дослідженню за мікробіологічним тестом були піддані 67 ізолятів роду *Fusarium* і було встановлено, що токсичні властивості (табл. 2) мали 23 штами (34,3%).

Таблиця 2

Ступінь токсичності грибів роду *Fusarium*

Види та різновидності	Досліджено ізолятів	З них виявлено			
		Т	СТ	АТ	усього токсичних
<i>F. sporotrichiella</i> var. <i>poae</i>	24	9	7	8	16
<i>F. sambucinum</i>	19	1	2	16	3
<i>F. oxysporum</i>	7	0	1	6	1
<i>F. semitectum</i>	3	0	1	2	1
<i>F. culmorum</i>	2	0	1	1	1
<i>F. gibbosum</i> var. <i>bullatum</i>	1	1	0	0	1
<i>F. heterosporum</i>	2	0	0	2	0
<i>F. moniliforme</i> var. <i>lactis</i>	1	0	0	1	0
<i>F. solani</i> var. <i>argillaceum</i>	1	0	0	1	0
<i>Fusarium</i> spp.	7	0	0	7	0

Примітка: Т – токсичні; СТ – слаботоксичні; АТ – атоксичні.

Токсичні фузарії належали до секцій *Sporotrichiella*, *Elegans*, *Roseum* та *Discolor*. Найбільше токсигенних ізолятів виявлено серед ізолятів виду *F. sporotrichiella* var. *poae*, менше – виду *F. sambucinum*, а решта токсичних були поодинокі і жоден із ізолятів *F. heterosporum*, *F. moniliforme* var. *lactis*, *F. solani* var. *argillaceum* не мали токсичних властивостей.

Із 50 досліджених зразків урожаю 2003 р. було виділено 42 (84%) ізоляти *Fusarium* spp., серед яких 12 культур (28,6%) продукували трихотеценові мікотоксини. У наступному році з такої ж кількості проб було виділено 25 (25%) культур фузаріїв, з яких 11 ізолятів (44%) були токсигенними. Це свідчить про те, що зі зниженням частоти поширення фузаріїв не спостерігається зниження контамінації зерна ячменю популяцією токсигенних ізолятів *Fusarium* spp.

Із досліджених фузаріїв Т-2 токсин продукували 22 ізоляти (*F. sporotrichiella* var. *poae*, *F. sambucinum*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *F. gibbosum* var. *bullatum*); зеараленон – 9 штамів (*F. culmorum*, *F. sporotrichiella* var. *poae*, *F. sambucinum*, *F. oxysporum*); ДОН – 3 штами (*F. culmorum*, *F. sporotrichiella* var. *poae*, *F. oxysporum*), а моніліформін – 3 (*F. sambucinum* та *F. oxysporum*).

Розробка способу експресного визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати зеараленон (F-2 токсин)

Діагностика мікотоксикозів передбачає проведення токсикологічних та мікологічних досліджень проб кормів, причетних до захворювання. При цьому проводиться мікологічне дослідження шляхом посіву матеріалу на поживні середовища з метою ізоляції штамів грибів та подальшого визначення їх здатності продукувати мікотоксини. З метою визначення потенційної здатності продукувати зеараленон гриби роду *Fusarium* культивують на зволжених стерильних зернових субстратах протягом 14 днів при $t^{\circ} 24^{\circ} \text{C}$, а потім від 2 до 8 тижнів при температурі 8–12 $^{\circ} \text{C}$, що є досить тривалим терміном.

Тому з метою скорочення терміну дослідження фузаріїв на здатність продукувати зеараленон було апробовано 8 живильних середовищ і встановлено, що найкращим для біосинтезу токсину виявився сусло-агар із глютаміновою кислотою (10г/л) у разі культивування впродовж 8 діб при $t^{\circ} 24^{\circ} \text{C}$ та 4 доби при $t^{\circ} 4^{\circ} \text{C}$, що дозволяло виявляти продуценти цього токсину значно швидше ніж за використання загальноприйнятих методик (табл. 3).

Таблиця 3

Продукція зеараленону (мкг/15 мл середовища) штамми *Fusarium* spp. за різних умов

Середовище	Вміст зеараленону		
	Режим 1	Режим 2	Режим 3
Сусло-агар	1,3±0,81	2,6±1,02	3,3±0,88

Сусло-агар із глютаміною кислотою	3,2±0,85	5,3±0,37	6,1±0,36
Чапека	2,9±0,69	4,75±0,4	5,6±0,34
Чапека з пептоном	2,1±0,7	2,6±0,78	2,8±1,04

Придатним для біосинтезу зеараленону виявилось середовище Чапека, на якому оптимальне токсиноутворення усіма досліджуваними штамми відбувалось у разі культивування протягом 8-ми діб при t° 24°C та 4-х діб при t° 4 °C. Однак кількість синтезованого зеараленону на середовищі Чапека була нижчою порівняно з культивуванням на сусло-агарі з глютаміною кислотою. На інших апробованих середовищах вміст зеараленону був мізерним.

Отже, розроблений спосіб дозволяє значно скоротити термін досліджень фузаріїв на здатність продукувати зеараленон з чотирьох тижнів до двох і знайде використання в лабораторіях ветеринарної медицини для діагностики зеараленонтоксикозу сільськогосподарських тварин. Його новизна підтверджена деклараційним патентом на корисну модель № 12712 від 15.02.2006.

Вивчення токсигенних властивостей грибів роду *Aspergillus*

Дослідженнями токсигенних властивостей аспергіл встановлено, що із 15 штамів пеніцилову кислоту продукували 2 штами *A. flavus*, а продуцентами ОТА були *A. ochraceus* та 2 штами *A. niger* (табл. 4). Проведеними дослідженнями нами вперше на території України виявлені штами *A. niger*, здатні продукувати охратоксин А. 4 штами *A. flavus* продукували коєву кислоту, яка виявлялась у культуральній рідині реакцією з феруму хлоридом та на хроматограмах – плямами світло-коричневого кольору з *Rf* 0 – 0,1. Крім того, усі досліджені ізоляти *A. flavus* були продуцентами аспергілової кислоти, однак жоден з них не продукував афлатоксинів.

Таблиця 4

Продукція мікотоксинів грибами роду *Aspergillus*

Види	Досліджено штамів	Продукували мікотоксини			
		Коєва кислота	Аспергілова кислота	Пеніцилова кислота	ОТА
<i>A. flavus</i>	6	4	6	2	-
<i>A. niger</i>	5	-	-	-	2
<i>A. ochraceus</i>	4	-	-	1	1
Всього	15	4	6	3	3

З метою підтвердження здатності культур *A. niger* продукувати охратоксин А вивчали біологічну дію екстрактів гриба на організм білих мишей. Для цього два виявлених штами-продуценти культивували на стерильному, зволоженому зерні пшениці і трьом білим мишам внутрішньочеревно вводили знежирений етилацетатний екстракт в дозі 0,3 мл. Характер дії токсину встановлювали

шляхом вивчення гістологічних змін в печінці та нирках загиблих тварин, порівнюючи з описаними змінами у мишей при експериментальному охратоксикозі А. У загиблих тварин на 1–3-тю добу було встановлено гіперемію серозних покривів черевної порожнини, у печінці – гостру застійну гіперемію (розширені центральні вени та міжбалкові капіляри), більшість гепатоцитів знаходились у стані мутного набухання, відмічалась декомплексація печінкових балок, а ядра клітин були в стані пікнозу, каріомегалії та каріорексису.

У нирках виявляли мікрокрововиливи, епітелій звивистих каналців знаходився у стані мутного набухання, внаслідок чого просвіт каналців слабо проглядався. Відмічалась десквамація каналцевого епітелію, а у просвіті каналців скопичувалась слабееозинофільна білкова маса та формувались циліндри. В клубочковому апараті ексудат, скопичуючись у капсулі Боумена-Шумлянського, відтісняв судинний клубочок на периферію.

Встановлені нами гістологічні зміни у печінці та нирках, як органах-мішенях для охратоксину А, були ідентичними змінам у цих органах, які виявили при експериментальному охратоксикозі мишей Р. Galtiter et al. (1974).

Експериментальний охратоксикоз перепела японського та вивчення впливу L-фенілаланіну на його перебіг

На початку досліду птахи трьох груп добре споживали корм, їх середня маса становила 180 г. Помітні зміни зовнішнього стану перепелів спостерігались на 12–14-й день досліду. У птахів, що отримували охратоксин А, спостерігалось зниження рухливості, мляве поїдання комбікорму, у деяких калові маси були розріджені, внаслідок чого пір'яний покрив у ділянці клоаки був забруднений, а в окремих розвивався кератокон'юнктивіт.

У групі птахів, що разом з охратоксином отримували розчин L-фенілаланіну, згадані вище ознаки були виражені меншою мірою, а у перепелів контрольної групи зазначених симптомів не було. Маса тіла птахів трьох груп не відрізнялась достовірно, однак приріст у контрольній групі був дещо вищий ніж у дослідних.

Біохімічними дослідженнями встановлено (табл. 5), що у сироватці крові перепелів, які отримували охратоксин, вміст сечовини з початку зростав більше, ніж удвічі. Різниця концентрації сечовини, порівняно з контрольною групою, становила 57,3 % і була статистично вірогідною. Це свідчить про розвиток ниркової недостатності у птахів під дією ОТА. У кінці досліду в сироватці крові перепелів цієї ж групи відмічалось зниження рівня сечовини порівняно з контролем на 30,9 %.

У групі перепелів, які разом з охратоксином отримували розчин L-фенілаланіну, вміст сечовини в сироватці крові на сьомий день був на рівні з контролем. Лише на чотирнадцятий день відмічали незначне зростання цього пока-

зника до 0,51 ммоль/л. Це вказує на протективну дію L-фенілаланіну щодо токсичного впливу ОТА на печінку та нирки.

Достовірних змін активності загальної ЛДГ під дією ОТА перепелів не встановлено, спостерігалась лише тенденція до незначного зростання активності ферменту у сироватці крові птахів першої групи на сьомий день досліду. Однак, у співвідношенні кардіоспецифічного ізоферменту ЛДГ₁ до загальної ЛДГ на чотирнадцятий день досліду відмічене зростання на 7,3 %, що свідчить про ураження кардіоміоцитів. Встановлене зростання активності аспартат- і аланінамінотрансфераз протягом усього досліду, і різниця в активності АЛТ контрольної та дослідної груп на чотирнадцяту добу була достовірною. Підвищення активності згаданих індикаторних для печінки ферментів може свідчити про розвиток синдрому цитолізу гепатоцитів, що також підтверджується результатами гістологічних досліджень. Коливання активності загальної ЛДГ, кардіоспецифічного ізоферменту ЛДГ₁, АСТ та АЛТ у сироватці крові перепелів, які разом з охратоксином отримували L-фенілаланін, порівняно з контролем, було слабовиражене.

Таблиця 5

Біохімічні показники сироватки крові перепелів при охратоксикозі; n=8, M±m

Показник	7 день			14 день		
	1 група	2 група	3 група	1 група	2 група	3 група
Сечовина, ммоль/л	0,96±0,14*	0,44±0,11	0,41±0,06	0,29±0,09**	0,51±0,13	0,42±0,08
ЛДГ _{заг.} , Од/л	464,0±38,42	393,0±33,2	448,6±29,78	411,0±40,35	443,0±42,1	439,6±30,63
ЛДГ ₁ , Од/л	148,9±13,2	115,1±19,8	134,6±13,5	158,6±16,4	151,5±16,2	137,6±14,8
ЛДГ ₁ /ЛДГ _{заг.} у проц.	32,1±3,9	29,3±3,5	30,5±7,8	38,6±4,8	34,2±4,3	31,3±4,8
АЛТ, ммоль/год•л	0,39±0,1	0,31±0,09	0,32±0,09	0,41±0,08**	0,33±0,07	0,28±0,06
АСТ, ммоль/год•л	3,57±0,41	3,24±0,3	2,97±0,36	3,7±0,46	3,23±0,39	3,17±0,23

Примітка: * – p < 0,01, ** – p < 0,05; порівняно з контролем.

Гістологічним дослідженням печінки перепелів, які протягом чотирнадцяти днів отримували охратоксин, по всій структурі органу було виявлено розширені судини, в більшості яких знаходились гемолізовані еритроцити у вигляді гомогенної рожевої маси. Спостерігались ділянки з судинами, заповненими негемолізованими еритроцитами. Більшість гепатоцитів були різних розмірів, мали зернис-

ту цитоплазму і значно збільшені ядра з малою кількістю хроматину та 1–4-ма базофільними ядерцями. Деякі клітини печінки мали ознаки каріорексису та каріолізу. Наявність поодиноких осередків клітин лімфоїдного ряду свідчили про можливий некроз гепатоцитів, що в цілому свідчило про розвиток гепатозу.

У звивистих каналцях нирок птахів виявляли клітини в стані мутного набухання, спостерігали некротичні процеси прямих і звивистих каналців, епітелій десквamuвався, а просвіт був заповнений оксифільними циліндрами та білковою масою. Наявність полібластів і епітеліоїдних клітин вказувала на розростання сполучнотканинних елементів, судини містили гемолізовані еритроцити, а в поодиноких випадках відмічали наявність крововиливів. Описані ознаки свідчать про розвиток нефриту та циротичних процесів під впливом охратоксину.

У міокарді перепелів виявляли у поздовжньому розрізі м'язів волокна з просвітленою цитоплазмою, у деяких кардіоміоцитах ядра були значно збільшені, каріоплазма просвітлена, а цитоплазма містила слабоеозинофільну зернистість. Поперечна посмугованість м'язових волокон не проглядалась, що в цілому свідчило про розвиток міокардиту.

У перепелів, яким одночасно з охратоксином вводили розчин L-фенілаланіну, в печінці виявляли білкову зернисту дистрофію, ядра гепатоцитів знаходились у стані каріорексису і каріолізу. Кровоносні судини були розширені, однак гемолізу еритроцитів не виявляли, відмічали проліферацію епітелію жовчних шляхів. Наявність осередків лімфоїдних клітин та описаних вище гістологічних змін свідчила про розвиток гепатозу у птахів, спричиненого охратоксином, однак для достовірного розуміння глибини патологічного процесу отримані дані слід розглядати з врахуванням результатів біохімічного дослідження крові.

У нирках перепелів цієї ж групи виявляли мутне набухання епітелію звивистих каналців, просвіт яких був заповнений білковою масою та оксифільними циліндрами. Однак, на відміну від гістологічних змін у нирках перепелів, що отримували лише ОТА, у даному випадку спостерігали менш виражені некротичні процеси та розростання сполучнотканинних елементів, що може свідчити про протективну дію L-фенілаланіну щодо впливу охратоксину.

Дослідженням структури міокарду на поздовжньому розрізі м'язових волокон виявляли поперечну посмугованість. Більшість ядер мали сигароподібну форму і містили помірну кількість хроматину. Описана гістокартина в поєднанні з біохімічними даними підтверджує антитоксичний вплив L-фенілаланіну щодо дії ОТА.

Таким чином, одночасне введення перепелам L-фенілаланіну в дозі 550 мг/кг та охратоксину послаблювало негативний вплив останнього, що є підставою для застосовування амінокислоти з профілактичною метою при охратоксикозі.

ВИСНОВКИ

1. Встановлений кількісний і якісний склад епіфітної і ендоефітної мікобіоти зерна ячменю урожаїв 2003 та 2004 рр. різних фізико-географічних регіонів України, та виявлені продуценти Т-2 токсину, зеараленону, моніліформіну, ДОНу, охратоксину, коєвої, аспергілової і пеніцилової кислот, і вперше встановлена здатність штамів *A. niger* продукувати охратоксин А. Розроблений експресний метод визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати зеараленон, встановлені оптимальні умови біосинтезу ОТА штамом *A. ochraceus*, вивчено вплив ОТА на організм білих мишей і перепелів та встановлено протективну дію L-фенілаланіну при охратоксикозі.

2. Мікологічними дослідженнями в 1 г зерна ячменю виявлено від $7,5 \times 10^2$ до $2,1 \times 10^4$ КУО грибів, що в середньому становить $6,6 \times 10^3 \pm 1,2 \times 10^3$; найбільше мікроміцетів знаходилось в зерні із зони Степу, а найменше – з лісостепової зони.

3. Мікобіота зерна ячменю представлена 27-ма видами та 6-ма різновидами грибів, що віднесені до 16-ти родів. Домінуючими були представники родів *Aspergillus* Mich., *Alternaria* Nees., *Rhizopus* Ehrenb., *Phoma* Sacc., *Penicillium* Link., *Drechslera* S.Ito., *Fusarium* Link., частими – ізоляти роду *Monascus* v. Tiegh., постійними – види *Absidia* Sacc., а решта ізолятів були рідкісними.

4. У зерні ячменю з регіону Полісся найбільш частими контамінантами є гриби родів *Fusarium* Link., *Penicillium* Link., *Alternaria* Nees., *Phoma* Sacc. та *Drechslera* S.Ito., в лісостеповій зоні – види *Monascus* v. Tiegh. та мукоральні гриби, а в Степу – *Aspergillus* Mich.

5. Токсикологічним дослідженням 67 культур фузаріїв токсичні властивості встановлені у 23-х штамів (34,3%): Т-2 токсин продукували 22 штами (*F. Sporotrichiella* var. *poae*, *F. sambucinum*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *F. gibbosum* var. *bullatum*); зеараленон – 9 штамів (*F. culmorum*, *F. sporotrichiella* var. *poae*, *F. sambucinum*, *F. oxysporum*); ДОН – 3 штами (*F. culmorum*, *F. sporotrichiella* var. *poae*, *F. oxysporum*) і моніліформін – 3 (*F. sambucinum* та *F. oxysporum*). Штам *F. sporotrichiella* var. *poae* 912/1 одночасно продукував Т-2 токсин і зеараленон та був причиною мікотоксикозу свиней.

6. З 8-ми досліджених живильних середовищ найкращим для біосинтезу зеараленону штамми *Fusarium spp.* виявився сусло-агар із глютаміновою кислотою (10 г/л) за культивування впродовж 8 діб при 24°C та 4 доби при 4 °C, що дозволяє виявляти продуценти цього токсину. На підставі проведених досліджень розроблено експресний метод визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати зеараленон і його новизна підтверджена деклараційним патентом на корисну модель № u 200508728.

7. Вперше в Україні у складі мікобіоти зерна ячменю виявлені штами *A. niger* і *A. ochraceus*, здатні продукувати охратоксин А, та продуценти коєвої, аспергілової і пеніцилової кислот серед видів *A. ochraceus* і *A. flavus*. Виділений

штам *A. ochraceus* 3 був причиною захворювання свиней, і з 12 досліджених зернових субстратів найактивніший біосинтез ОТА цим грибом спостерігався на зерні гороху та пшениці із середовищем Чапека.

8. Внутрішнє введення п'ятиденним перепелам охратоксину у дозі 5 мг/кг упродовж 14 діб призводило до розвитку хронічного охратоксикозу, що супроводжувався з початку підвищенням вмісту в сироватці крові сечовини з наступним зниженням та зростанням співвідношення кардіоспецифічного ізоферменту ЛДГ₁ і загальної ЛДГ та підвищенням активності АЛТ і АСТ.

9. Гістологічними дослідженнями печінки, нирок та міокарду при охратоксикозі перепелів встановлені нефрит, нефроз, гепатоз і міокардит, а також каріомегалія, каріорексис, каріолізис і пікноз ядер гепатоцитів та клітин ниркових каналців.

10. Одночасне введення з охратоксином L-фенілаланіну в дозі 550 мг/кг послаблювало токсичну дію на організм перепела японського, що свідчить про можливість використання цієї амінокислоти з метою профілактики охратоксикозу.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Спосіб експресного визначення здатності грибів *Fusarium spp.* продукувати зеараленон (F-2 токсин) пропонується до застосування у лабораторіях ветеринарної медицини країни та у лабораторіях науково-дослідних установ.

2. Для дослідження зерна ячменю з метою постановки діагнозу на мікотоксикози необхідно враховувати ймовірність контамінації продуцентами T-2 токсину, зеараленону, ДОНу, моніліформіну, охратоксину, коєвої, аспергілової і пеніцилової кислот та зазначеними мікотоксинами. При цьому брати до уваги, що *Fusarium spp.* та *Penicillium spp.* частіше контамінують зерно ячменю північних регіонів країни, а *Aspergillus spp.* – південних.

3. У випадку ураження зерна ячменю грибами *A. niger* необхідно досліджувати зерно на наявність ОТА, а гриби – на здатність синтезувати цей мікотоксин.

4. Для зменшення негативного впливу охратоксину А на організм перепела японського застосовувати L-фенілаланін в дозі 550 мг/кг маси тіла.

5. Матеріали дисертаційної роботи включати в навчальний процес з курсів “Ветеринарна мікробіологія” і “Ветеринарна токсикологія” для підготовки фахівців ветеринарної медицини і для слухачів післядипломної освіти та використовувати в науково-дослідній роботі.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Андрійчук А.В. Продукування охратоксину А штамами гриба *Aspergillus niger* van Tiegh // Вісник аграрної науки. – 2007. – №4. – С.79–80.

2. Асоційований перебіг фузаріо-Т-2 і F-2 токсикозів у свиней / В. Рухляда, В. Левченко, В. Гарькавий, **А. Андрійчук**, В. Овчаренко, В. Петренко // Ветеринарна медицина України. – 2005. – №7. – С. 16–18. (Дисертантом проведено токсикомікологічні дослідження, проаналізовано та узагальнено отримані результати).

3. Аспергільозотоксикоз поросят, викликаний токсигенним штамом *Aspergillus ochraceus* Wilhelm / В. Рухляда, І. Папченко, С. Тарануха, **А. Андрійчук** // Ветеринарна медицина України. – 2006. – №10. – С.16–17. (Дисертант брав участь у проведенні досліджень, ним узагальнено результати та підготовлено матеріали статті до друку).

4. Охратоксикоз перепела японського та вплив L-фенілаланіну на його перебіг / **А.В. Андрійчук**, В.В. Рухляда, П.В. Шарандак, А.Ю. Мельник // Вісник Білоцерківського ДАУ. – 2007. – Вип.44. – С. 20–23. (Дисертант склав схему експерименту, виконав його, узагальнив отримані дані та підготував матеріали для публікації).

5. Рухляда В.В., **Андрійчук А.В.**, Білан А.В. Розробка способу експресного визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати зеараленон // Науковий вісник НАУ. – 2007. – Вип.108. – С. 179–184. (Дисертант розробив спосіб експресного визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати зеараленон та оформив матеріали для публікації).

6. Рухляда В.В., **Андрійчук А.В.**, Соколова О.В. Мікологічний моніторинг зерна ячменю в різних фізико-географічних регіонах України // Вісник Білоцерківського ДАУ. – 2006. – Вип.36. – С. 149–155. (Дисертантом проведено мікологічні дослідження, проаналізовано і узагальнено одержані результати та підготовлено матеріали статті до друку).

7. Пат. UA, 12712С12N 5/00 В23Н3/00. Спосіб експресного визначення здатності грибів *Fusarium spp.* продукувати зеараленон / В.В. Рухляда, **А.В. Андрійчук**, А.В. Білан. – № u 200508728; Заявл. 13.09.2005; Опубл. 15.02.2006, Бюл. №2. (Дисертант провів експериментальні дослідження, опрацював результати, розробив спосіб експресного визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати зеараленон та оформив деклараційний патент України на винахід).

АНОТАЦІЯ

Андрійчук А.В. Мікобіота зерна ячменю, біосинтез та біологічна дія охратоксину А. – Рукопис. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03. – ветеринарна мікробіологія та вірусологія. – Одеський державний аграрний університет. – Одеса, 2007.

Дисертація присвячена вивченню мікобіоти зерна ячменю, вирощеного в Україні, встановленню її токсигенності і видів токсинів, що продукують контамінанти зерна, дослідженню біологічної дії охратоксину А із встановленням антитоксичної ефективності L-фенілаланіну при охратоксикозі перепелів. Досліджений кількісний та якісний склад епіфітної та ендоефітної мікобіоти зерна ячменю різних фізико-географічних регіонів України. Серед виділених мікроміцетів виявлені продуценти Т-2, F-2 токсинів, дезоксиніваленолу, моніліформіну, охратоксину А, пеніцилової, коевої та аспергілової кислот. Вперше в Україні серед мікобіоти зерна ячменю виявлені штами *A. niger*, здатні продукувати охратоксин А, та експериментально визначені оптимальні умови для отримання максимальної кількості ОТА при культивуванні штамів *A. ochraceus*. Вивчено вплив ОТА на організм перепела японського та встановлено протективну дію L-фенілаланіну при охратоксикозі. Розроблений експресний метод визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати зеараленон, на який отримано деклараційний патент на корисну модель № u 200508728.

Ключові слова: мікобіота, мікотоксини, біосинтез, токсичність, ідентифікація продуцентів, охратоксикоз, протективна дія.

АННОТАЦИЯ

Андрийчук А.В. Микобиота зерна ячменя, биосинтез и биологическое действие охратоксина А. – Рукопись. Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03. – ветеринарная микробиология и вирусология. – Одесский государственный аграрный университет. – Одесса, 2007.

Диссертация посвящена изучению микобиоты зерна ячменя, выращенного в Украине, установлению ее токсигенности и видов токсинов, которые продуцируют контаминанты зерна, исследованию биологического действия охратоксина А с изучением антитоксической эффективности L-фенилаланина при охратоксикозе перепелов.

Установлен количественный и качественный состав эпифитной и эндофитной микобиоты зерна ячменя разных физико-географических регионов Украины. Микобиота зерна ячменя представлена микромицетами 16-ти родов, которые отнесены к 27-ми видам и 6-ти разновидностям. Грибы родов *Fusarium* и *Penicillium* более часто контаминировали зерно, выращенное на Полесье, в меньшей степени – зерно из Лесостепи и реже всего – степной зоны, при этом разница в контаминации достоверна. Изоляты *Aspergillus spp.*, наоборот, чаще встречались в пробах зерна из южных областей, реже – из лесостепной зоны и Полесья. Среди выделенных микромицетов выявлены продуценты Т-2, F-2 токсинов, дезоксиниваленола, монилиформина, охратоксина А, пенициловой, коевой и аспергилловой кислот. Впервые в Украине среди микобиоты зерна ячменя выявлены штаммы *A. niger*, способные продуцировать охратоксин А. Экспериментально определены оптимальные условия для получения максимального количества ОТА при культивировании штаммов *A. ochraceus*. Установлено, что из 12 исследованных зерновых субстратов наиболее активный биосинтез наблюдался на зерне гороха и пшеницы со средой Чапека. Введение пятидневным японским перепелам массой 180 г охратоксина в дозе 5 мг/кг массы тела на протяжении 14 дней приводило к развитию хронического охратоксикоза. Одновременное введение L-фенилаланина в дозе 550 мг/кг и ОТА в указанном количестве ослабляло его токсическое влияние на организм птицы. Из 8-ми исследованных питательных сред оптимальной для биосинтеза зеараленона штаммами *Fusarium spp.* был сусло-агар с глутаминовой кислотой (10 г/л) при культивировании на протяжении 8-ми суток при 24 °С и 4 суток при 4 °С, что позволяло определять продуценты этого токсина. На основании проведенных исследований разработан экспрессный метод определения способности грибов рода *Fusarium* продуцировать F-2 токсин, и его новизна подтверждена декларационным патентом на полезную модель № 200508728.

Ключевые слова: микобиота, микотоксины, биосинтез, токсичность, идентификация продуцентов, охратоксикоз, протективное действие.

ANNOTATION

Andriyчук A.V. Micobiots of barley grain, biosynthesis and biological action of ochratoxin A. The dissertation on competition of a scientific degree of the candidate of veterinary science on specialty 16.00.03. – veterinary microbiology and virology. – Odessa State Agrarian University. – Odessa, 2006

This dissertation is devoted to the investigation of micobiots of barley grain, which was grown in Ukraine and to determination of its toxigenics and kind of toxins, that produce fungi, researching

of biological action of ochratoxin A with the analysis antitoxic effects of L-phenylalanine in ochratoxicosis of quails.

The quantitative and qualitative compound mycobiota of barley grain in different regions of Ukraine was investigated. Among marked micromycetes the producers of T-2, F-2 toxins, deoxynivalenol, moniliformin, ochratoxin A, penicillic, kojic and aspergillic acid were detected. Firstly in Ukraine the strains of *A. niger* were opened, which suitable for produce ochratoxin A. Optimal conditions for receiving of maximum quantity of OTA in cultivation of strains *A. ochraceus* were experimentally determined. The impact of OTA on the organism of quails has been studied and it was determined the protective effects of L-phenylalanine in ochratoxicosis quails. The experimental rapid method determination of ability of strains *Fusarium* to produce zearalenone was worked out and for such investigations was given a declaring patent on the useful model № u 200508728.

Key words: micobiota, micotoxins, biosynthesis, toxicity, producers identification, ochratoxicosis, protective effects.

Підписано до друку 21.12.2007.

Формат 60x90^{1/16}. Ум. др. арк. 0,9. Зам. 3848. Тираж 100.

Сектор оперативної поліграфії РВІКВ БДАУ.

09117, Біла Церква, Соборна площа, 8, тел. 3-11-01.