

**ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**БІЛАН АНДРІЙ ВАЛЕРІЙОВИЧ**

**УДК 619:615.918:633.15:582.28**

**МІКРОМІЦЕТИ ЗЕРНА ВІВСА, ЇХ ТОКСИГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ ТА  
ВПЛИВ ФУМОНІЗИНУ В<sub>1</sub> НА КУРЧАТ**

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

**дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата  
ветеринарних наук**

Одеса – 2009

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Білоцерківському національному аграрному університеті  
Міністерства аграрної політики України

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

**Офіційні опоненти:** доктор ветеринарних наук, професор  
**Ковальов Василь Львович**,  
Національний університет біоресурсів і  
природокористування України,  
Південна філія “КАТУ”,  
завідувач кафедри епізоотології, паразитології та  
ветсанекспертизи

кандидат ветеринарних наук  
**Корзуненко Ольга Федотівна**,  
Інститут ветеринарної медицини УААН  
зав. лабораторії мікотоксикології

Захист дисертації відбудеться 02.07.2009 р. о 14 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. \_\_\_\_\_.

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

Автореферат розісланий 30.05.2009 р.

**Вчений секретар**  
спеціалізованої вченої ради \_\_\_\_\_ **С.І. Масленікова**

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Овес є однією з цінних зернових культур в годівлі сільськогосподарських тварин, а продукти його промислової переробки використовуються в харчуванні людей, косметологічній та фармацевтичній галузях. Це культура помірною клімату, не вибаглива до тепла, більш поширена в зонах Полісся і Лісостепу.

Різні види мікроскопічних грибів, в тому числі і токсигенні, можуть вражати зернові культури, в тому числі і зерно вівса, тому існує небезпека накопичення в ньому мікотоксинів. Споживання такого зерна сільськогосподарськими тваринами призводить до розвитку мікотоксикозів, які характеризуються зниженням продуктивності та загибеллю тварин (Саркісов А.Х., 1954; Тутельян В.А., Кравченко Л.В., 1985).

В Україні періодично діагностуються випадки фузаріотоксикозів у сільськогосподарських тварин та птиці, що викликані споживанням кормів, контамінованих Т-2 та F-2 токсинами. Вони зареєстровані у Київській, Кіровоградській, Вінницькій, Миколаївській, Харківській, Черкаській та Одеській областях, де поряд із токсинами, причетними до захворювання кормів, були виявлені фузарії – продуценти цих токсинів (Рухляда В.В., 2002, Котик А. М., 1999).

Останнім часом значна увага приділяється токсинам гриба *Fusarium moniliforme* у зв'язку із захворюванням конячих на лейкоенцефаломаліацію, набряком легенів у свиней, а також первісним раком стравоходу та гепато- і кардіотоксичністю у людей. Цей гриб продукує ряд фузаріотоксинів, серед яких найбільш важливими є моніліформін (Cole R.J. et al., 1973) та фумонізін (Gelderblom W.C.A. et al., 1988), який вважається причиною захворювання коней та свиней (Harrison L.R. et al., 1990.; Ross P.F. et al., 1990). Проте в нашій країні ці токсини майже не вивчалися, хоча токсичні штами гриба були виявлені на зернових, в тому числі і на зерні вівса (Леонов А.Н. та ін., 1991; Погребняк Л.І. та ін., 1998; Харченко С.М., 2003; Труфанова В.О., 2004).

До теперішнього часу цілеспрямованого вивчення мікобіоти зерна вівса не проводилося, тому ще не встановлені види мікроміцетів, що контамінують зерно цієї культури. Не встановлене зональне розповсюдження грибів на зерні вівса і не вивчені види мікотоксинів, які вони продукують. Також залишаються ще невивченими окремі питання біосинтезу, біологічної дії фузаріотоксинів гриба *Fusarium moniliforme* та профілактики.

Тому вивчення зазначених питань є актуальним і буде сприяти покращанню діагностики та профілактики цих фузаріотоксикозів сільськогосподарських тварин.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація є розділом науково-дослідної роботи кафедри мікробіології та вірусології Білоцерківського національного аграрного університету "Вивчення ролі мікроскопічних грибів та їх метаболітів у патології сільськогосподарських тварин" (№ держреєстрації 0103U004470).

**Мета роботи** – вивчення розповсюдження мікроміцетів на зерні вівса в різних регіонах України, визначення їх токсичних властивостей, дослідження біосинтезу моніліформіну та фумонізину В<sub>1</sub> грибом *Fusarium moniliforme*, біологічного впливу фумонізину В<sub>1</sub> на організм курчат і протективної дії мікосорбу за фумонізін-токсикозу.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

- вивчити кількісний та якісний склад мікобіоти зерна вівса урожаю 2004–2005 років з різних регіонів України;
- дослідити токсичні властивості грибів родів *Fusarium* та *Aspergillus* та види мікотоксинів, що вони продукують;
- вивчити вплив факторів зовнішнього середовища на біосинтез моніліформіну та фумонізину В<sub>1</sub> грибом *Fusarium moniliforme*;
- провести дослідження з вивчення дії культуральної рідини гриба *F. moniliforme* на організм білих мишей, а також вплив фумонізину В<sub>1</sub> на курчат і протективну дію мікосорбу;
- розробити експрес-метод визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати F-2 токсин.

**Об'єкт дослідження** – мікобіота зерна вівса та біосинтез мікотоксинів.

**Предмет дослідження** – мікроміцети зерна вівса, їх токсигенні властивості та вплив фумонізину В<sub>1</sub> на курчат. Мікотоксини, біохімічні, патолого-анатомічні та гістологічні показники як критерії оцінки токсичного впливу моніліформіну та фумонізину В<sub>1</sub> та протективної дії мікосорбу щодо впливу токсинів.

**Методи дослідження.** *Мікологічні* – визначення кількісного та якісного складу епіфітної та ендоефітної мікобіоти зерна вівса. *Мікотоксикологічні* – вивчення здатності виділених грибів продукувати мікотоксини. *Клінічні та біохімічні* – дослідження показників клінічного статусу та активності аспарагінової трансферази (АСТ), аланінової трансферази (АЛТ), загальної лактатдегідрогенази (ЛДГ<sub>заг</sub>) та її серцевої фракції – (ЛДГ<sub>1</sub>), загальної лужної фосфатази (ЛФ) та її кісткового й кишкового ізоферментів, вміст загального, ультрафільтрованого, іонізованого, нейтрального та білокзв'язаного кальцію та рівень сечовини і креатиніну. *Патолого-анатомічні та гістологічні* – вивчення характеру

морфологічних змін в організмі тварин за мікотоксикозів та *математично-статистичний метод* – для опрацювання отриманих експериментальних даних.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше встановлений кількісний та якісний склад мікобіоти зерна вівса з різних регіонів України та виявлена достовірна різниця у контамінації грибами родів *Aspergillus* та *Penicillium* в зонах Полісся, Лісостепу та Степу. Серед грибів роду *Fusarium* встановлені продуценти Т-2 токсину, зеараленону, моніліформіну, фумонізіну В<sub>1</sub>, фузарину С та фузарієвої кислоти, а серед грибів роду *Aspergillus* – продуценти коєвої кислоти. Вперше на території України встановлена здатність гриба *Alternaria alternata* синтезувати фумонізін В<sub>1</sub>.

Встановлені зміни морфологічного та біохімічного складу крові коней за хронічного фузаріотоксикозу та впливу культуральної рідини *F. moniliforme* на білих мишей.

Експериментально доведено, що фумонізін В<sub>1</sub> у курчат спричинив розвиток гепатозу та порушення мінерального обміну, а використання мікосорбу покращувало біохімічні показники та зменшувало негативний вплив токсину на печінку курчат.

Новизна розробленого експрес-методу визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати F-2 токсин (зеараленон), підтверджена деклараційним патентом на корисну модель № 200508728 від 15.02.2006 “Спосіб експресного визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати F-2 токсин”.

**Практичне значення одержаних результатів.** Встановлена забрудненість зерна вівса з різних регіонів України мікроміцетами, в тому числі грибами роду *Fusarium*, що продукують різні фузаріотоксини – Т-2 токсин, F-2 токсин (зеараленон), моніліформін, фумонізін В<sub>1</sub>, фузарин С та фузарієву кислоту; грибами роду *Aspergillus* – продуцентами коєвої кислоти, що допоможе прогнозувати можливий розвиток мікотоксикозів.

Визначені оптимальні режими біосинтезу моніліформіну та фумонізіну В<sub>1</sub> будуть використовуватися для напрацювання токсинів і постановки дослідів та отримання стандартів для мікотоксикологічних досліджень кормів.

Встановлені зміни морфологічного та біохімічного складу крові коней за хронічного фузаріотоксикозу будуть використані для діагностики захворювання.

Згодовування мікосорбу курчатам в кількості 2 % на кг корму зменшує негативний вплив мікотоксинів на організм птиці, що можна використовувати для профілактики фузаріотоксикозу.

Розроблений експрес-метод визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати F-2 токсин, який придатний для застосування у районних та обласних лабораторіях ветеринарної медицини країни, а також у Республіканській державній лабораторії ветеринарної медицини АР Крим та наукових установах під час діагностики фузаріотоксикозів сільськогосподарських тварин. Отримані результати досліджень застосовуються в навчальному процесі під час підготовки фахівців ветеринарної медицини у Білоцерківському національному аграрному університеті та у наукових дослідженнях ветеринарних і токсикологічних лабораторій.

**Особистий внесок дисертанта.** Здобувач розглянув та проаналізував вітчизняні та іноземні літературні джерела з теми дисертаційної роботи, розробив плани та схеми і виконав експериментальні дослідження, провів статистичну обробку одержаних результатів, їх аналіз, узагальнення та сформулював висновки і практичні рекомендації.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертації доповідались на міжнародній науково-практичній конференції “Наукові та практичні аспекти ветеринарної медицини в Україні” (Білоцерківський ДАУ, м. Біла Церква, 2006), V державній науковій конференції аспірантів та докторантів “Наукові пошуки молоді у третьому тисячолітті” (Біла Церква, 2006), V державній науково-практичній конференції “Аграрна наука – виробництво: сучасні проблеми ветеринарної медицини” (Біла Церква, 2006), VI державній науково-практичній конференції “Аграрна наука – виробництво: сучасні проблеми ветеринарної медицини” (Біла Церква, 2007), науково-практичній конференції “Сучасні проблеми ветеринарної фармакології, токсикології і фармації” (УААН НАУ, м. Київ, 2006), VI науково-практичній конференції молодих вчених, аспірантів та докторантів “Наукові пошуки молоді у третьому тисячолітті” (Біла Церква, 2007).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 6 наукових статей у фахових виданнях, а саме 4 статті у “Віснику Білоцерківського ДАУ” (2007, 2008), по одній у “Науковому віснику НАУ” (2007), та “Ветеринарній біотехнології” ІВМ (2007р.), а також 8 тез доповідей.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, загальної методики та основних методів дослідження, результатів досліджень та їх обговорення, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел і додатків. Робота містить 5 розділів, викладена на 125 сторінках комп’ютерного набору, містить 23 таблиці та 15 рисунків. Список літератури включає 227 джерел, з яких 112 – іноземних авторів.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційна робота виконувалась у науково-дослідній лабораторії кафедри мікробіології та вірусології Білоцерківського національного аграрного університету протягом 2004–2007 рр. Консультативну допомогу у проведенні видової ідентифікації деяких ізольованих мікроскопічних грибів отримували у відділі фізіології і систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України у кандидата біологічних наук О.В. Соколової.

Для дослідження були відібрані 100 зразків зерна вівса урожаю 2004 та 2005 років (по 50 проб щорічно) у сільськогосподарських та зернопереробних підприємствах згідно з діючим ГОСТ'ом 13586.3–83 та ДСТУ 3570–97 у трьох фізико-географічних регіонах країни в період його зберігання. Зона Полісся була представлена зразками зерна Чернігівської, Сумської, Київської та Івано-Франківської обл.; зона Лісостепу – Черкаської, Вінницької, Хмельницької обл.; зона Степу – Дніпропетровської, Донецької, Запорізької областей та АР Крим.

Епіфітну мікобіоту виявляли методом прямої інокуляції, для чого по 6–7 зерен розкладали 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, посіви культивували за температури 24 і 37 °С протягом тижня.

З метою визначення кількісного складу мікобіоти використовували метод серійних розведень. Для цього наважку зерна масою 10,0 г подрібнювали та готували серійні розведення 1:100, 1:1000 та 1:10000, які в об'ємі 1 мл вносили на середовище Чапека у дві чашки Петрі і розподіляли по поверхні. Інкубацію посівів проводили за температури 24 та 37 °С і кількість колоній підраховували на 3–5-й день, а вміст колонієутворювальних одиниць (КУО) розраховували за І.П. Ашмаріним, А.А. Воробйовим (1962). Ідентифікацію виділених культур проводили на підставі культурально-морфологічних показників з використанням визначників грибів (Підоплічко Н.М., 1972; Domsch K.H. et al., 1980; Білай В.И., Коваль Э. З., 1988; Саттон Д. та ін., 2001). У випадку, коли у культур фузаріїв не спостерігалось конідієутворення, використовували метод мікрокультури (Білай В.И., Элланска И.А., 1975).

Визначення токсичності у грибів роду *Fusarium* проводили мікробіологічним методом, з використанням агарових блоків та паперових дисків, зволжених екстрактами із культур грибів, на підставі пригнічення росту тест-культури мікроорганізму *Candida pseudotropicalis* шт. 44 ПК

(Рухляда В.В., Башмакова Е.В., 1988). Здатність продукувати Т-2 токсин встановлювали методом ТШХ з біоавтографією (Рухляда В.В. та ін., 2003).

З метою встановлення здатності фузаріїв продукувати зеараленон використовували метод Mirocha C.J., et al. (1971). Пластини обприскували 20%-ним розчином сірчаної кислоти в метанолі з наступним прогріванням протягом 5 хв за температури 110–120 °С, після чого він набував вигляд плям жовто-цегляного кольору. Окрім того, використовували розроблену за нашою участю методику експресного визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати зеараленон.

Для встановлення здатності продукувати моніліформін фузарії культивували на зерні рису та вівса, і токсин визначали методом ТШХ за Rabie J.C. et al. (1978). Моніліформін проявляли обприскуванням хроматограм розчином 2,4-динітрофенілгідразину в соляній кислоті з наступним прогріванням протягом 10 хв за температури 110 °С. Після чого токсин проявлявся у видимому світлі плямами червоно–коричневого кольору з *Rf* 0,25–0,3.

Здатність фузаріїв синтезувати фузарин С встановлювали методом ТШХ за C.W. Vason et al., (1989). Гриби культивували на зерні рису, екстракцію проводили етилацетатом, а прояв токсину на хроматограмах – розчином сірчаної кислоти. Токсин проявлявся плямами яскраво-жовтого кольору з *Rf* 0,85–0,9.

Присутність фумонізину В<sub>1</sub> визначали ТШХ за J. Dupuy, P. Le Bars, (1993). Культури грибів на рисі екстрагували сумішню ацетонітрил–вода (1:1), розподіл екстракту проводили у системі розчинників бутанол–оцтова кислота–вода (2:1:1), а хімічний прояв здійснювали 0,5%-ним розчином анісового альдегіду. Токсин проявлявся плямами яскраво жовтого кольору з *Rf* 0,6–0,65.

20 культур *Aspergillus flavus* досліджували на здатність продукувати афлатоксини і коєву кислоту. Для цього гриби вирощували на цукрово-дріжджовому середовищі протягом 10 діб за температури 25 °С. Токсин екстрагували гарячим хлороформом і екстракт досліджували ТШХ. Коєва кислота після обробки розчином хлориду заліза проявлялася у вигляді плям коричнево-вишневого кольору з *Rf* 0–0,1, а афлатоксин В<sub>1</sub> в УФ-променях виявлявся плямами блакитного кольору з *Rf* 0,35–0,37 (Львова Л.С. и др., 1978).

У досліджах з вивчення біосинтезу моніліформіну і фумонізину В<sub>1</sub> на зернових субстратах використовували ізольовані із зерна кукурудзи та вівса штами 608/2 та 1170/5 *F. moniliforme*, які культивували на стерильних зволжених зернах пшениці, рису, проса, ячменю, кукурудзи, сої, вівса,



гречки, гороху та насінні соняшнику масою 10,0 г у колбах ємністю 50 мл протягом 21-ї доби за 24 °С. Вплив вологості на продукцію токсинів вивчали, культивуючи гриби на зерні рису з вологістю 20, 30, 40, 50, 60, 70 та 80 %. Для визначення оптимальної температури та режиму культивування гриби вирощували на зерновому субстраті 50 %-ної вологості за температури 4, 10, 24 і 37 °С та протягом 7, 14, 21 та 28 діб. В культурах провели напівкількісне визначення вмісту токсинів.

Біологічну дію культуральної рідини гриба *F. moniliforme* на білих мишей вивчали шляхом одноразового внутрішньочеревного її введення в дозі 0,5 мл, а контрольним – по 0,5 мл стерильного середовища Чапека-Докса. У загиблих відмічали патзміни і гістологічно досліджували серце та печінку.

Для вивчення впливу фумонізину В<sub>1</sub> на курчат штаму 1170/5 *F. moniliforme* культивували на стерильному, зволоженому зерні пшениці за температури 24 °С протягом 21 доби. Токсин екстрагували сумішшю ацетонітрил – вода (1:1) та переекстрагували у 5 %-ний водний етанол і вміст токсину визначали методом ТШХ та ІФА у хіміко-токсикологічному відділі державного науково-дослідного інституту діагностики і ветсанекспертизи м. Київ.

У досліді були використані 30 курчат 5-тижневого віку м'ясо-яєчної породи "Адлер сріблястий" середньою масою 208 г, з яких було сформовано 3 групи по 10 голів у кожній. Курчатам першої групи один раз на добу вводили перорально по 8 мг фумонізину В<sub>1</sub> у 5 %-ному водному етанолі, курчата другої групи отримували таку ж дозу токсину і комбікорм з мікосорбом у кількості 2 % на кілограм корму. Третя група слугувала контролем і не отримувала ні токсин, ні мікосорб. За курчатами вели постійне клінічне спостереження, враховували їх загальний стан та один раз на тиждень визначали масу тіла. В кінці кожного тижня по троє курчат з кожної групи забивали методом декапітації й відбирали проби крові для біохімічного дослідження, а шматочки печінки – для гістологічного.

У сироватці крові курчат визначали вміст загального, ультрафільтрованого, іонізованого, нейтрального та білокзв'язаного кальцію – в реакції з гліюксаль-біс-2-оксалином; неорганічного фосфору – реакцією з аскорбіновою кислотою; активність загальної лужної фосфатази (ЛФ) та її кісткової й кишкової ізоферментів – за методом Вагнера, Путиліна і Харабури; кислій фосфатази (КФ) – реакцією з 4-нітрофенілфосфатом. Рівень сечовини досліджували за діацетилмонооксимним методом; активність загальної лактатдегідрогенази (ЛДГ<sub>заг</sub>), її кардіоспецифічного ізоферменту (ЛДГ<sub>1</sub>) – за методом Севела-Товарека, аланінової трансферази (АлАТ) і аспарагінової трансферази (АсАТ) – уніфікованим методом Райтмана –

Френкеля. Біохімічні дослідження сироватки крові проводились спільно зі співробітниками кафедри терапії та клінічної діагностики Білоцерківського НАУ асистентом І.А. Жилою та аспірантами П.В. Шарандаком і А.Ю. Мельником, а інтерпретація результатів – за консультативної допомоги академіка УААН, доктора ветеринарних наук, професора В.І. Левченка. Гістологічні зміни та їх інтерпретацію здійснювали за консультативної допомоги доцентів кафедри ветсанекспертизи та патанатомії М.В. Утеченка та І.В. Папченка. Для розробки експресного способу визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати зеараленон використовували шість культур фузаріїв різної токсинопродукуючої активності, здатність яких продукувати зеараленон була встановлена раніше, а також 14 культур гриба *F.moniliforme*.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### Мікроміцети зерна вівса

Мікологічними дослідженнями встановлено, що в одному грамі зерна урожаїв двох років кількість колонієутворювальних одиниць (КУО) коливалась в межах від  $1,8 \cdot 10^3$  до  $8,7 \cdot 10^4$  і в середньому становила  $1,78 \cdot 10^4 \pm 4,55 \cdot 10^3$ . При цьому у 2004 році кількість КУО становила  $2,16 \cdot 10^4 \pm 8,1 \cdot 10^3$ , а у 2005 році –  $1,5 \cdot 10^4 \pm 2,6 \cdot 10^3$ , що свідчить про відсутність суттєвої різниці в показниках. У зоні Полісся кількість КУО була  $1,88 \cdot 10^4 \pm 4,29 \cdot 10^3$ , Лісостепу –  $1,86 \cdot 10^4 \pm 2,75 \cdot 10^3$  та Степу –  $1,65 \cdot 10^4 \pm 4,55 \cdot 10^3$  і найбільше КУО було в зоні Полісся у 2004 році –  $2,8 \cdot 10^4 \pm 8,1 \cdot 10^3$ , а у 2005 році в цій зоні було навпаки найменше КУО –  $8,3 \cdot 10^3 \pm 4,8 \cdot 10^3$ .

Зі 100 зразків зерна було виділено 562 культури грибів, віднесених до 2-х класів 9 родів, 418 з яких були ідентифіковані і представлені 16-ма видами і 4-ма різновидами. Найчастіше на зерні вівса зустрічалися представники родів *Alternaria* (92%), *Mucor* і *Aspergillus* (по 81%), *Fusarium* (77%) та *Penicilium* (39%).

Щодо зонального розповсюдження, то в зоні Полісся *Alternaria alternata* виділялася з усіх проб та з 82 і 91 % проб відповідно зон Лісостепу та Степу. Другими за частотою розповсюдження були мукоральні гриби, представлені двома родами *Mucor* та *Absidia*, вони найчастіше зустрічалися в зерні із зони Степу та Лісостепу і рідше – із зони Полісся.

З такою ж частотою на зерні вівса виявляли гриби роду *Aspergillus*, їх знаходили в усіх пробах зони Степу, трохи рідше у зоні Лісостепу та зрідка на Поліссі. Вони представлені п'ятьма видами і найчастіше зустрічалися види *Aspergillus flavus* та *Aspergillus fumigatus*, що були знайдені в усіх пробах зони Степу, рідше – Лісостепу та у двох третинах проб з Полісся (табл.1).

## Частота контамінації мікроміцетами зерна вівса в різних зонах України

Види мікроміцетів	Зони						Всього 100 проб	
	Полісся 45 проб		Лісостеп 33 проби		Степ 22 проби			
	факт.	%	факт.	%	факт.	%	факт.	%
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl	45	100	27	82	20	91	92	92
<i>Mucor ramosissimus</i>	2	4,4	3	9	2	9	7	7
<i>Absidia corymbifera</i> (Cohn) Jacc. Et A.Trotter	-	-	-	-	1	4,5	1	1
<i>Mucor spp.</i>	30	67	30	91	20	91	80	80
<b>Разом мукоральних</b>	30	67	30	91	21	95	81	81
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fres.	19	42	22	67	15	68	56	56
<i>Aspergillus flavus</i> Zr:Fr	14	31	24	73	19	86	57	57
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	16	35	4	12	11	50	31	31
<i>Aspergillus terreus</i> Thom.	1	2,2	1	3	4	18	6	6
<i>Aspergillus ochraceus</i> Wilhelm	-	-	-	-	1	4,5	1	1
<b>Разом аспергіл</b>	30	67	29	88	22	100	81	81
<i>Fusarium sporotrichiella</i> Bilai	21	46	10	30	3	14	34	34
<i>Fusarium sporotrichiella</i> Bilai var. <i>poae</i> (Peck) Wollemv	9	20	1	3	1	5	11	11
<i>Fusarium sporotrichiella</i> var. <i>tricinctum</i>	1	2,2	-	-	-	-	1	1
<i>Fusarium oxysporum</i> (Schlecht.) Snyd. et. Hans	4	9	3	9	3	14	10	10
<i>Fusarium moniliforme</i> Sheld.	2	4,4	1	3	4	18	7	7
<i>Fusarium moniliforme</i> Sheld. var. <i>lactis</i> Pirota et Ribon	1	2,2	-	-	4	18	5	5
<i>Fusarium sambucinum</i> Fuck. var. <i>minus</i> Wr	1	2,2	-	-	-	-	1	1
<i>Fusarium semitectum</i> Berk. et. Rav	1	2,2	1	3	-	-	2	2
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	1	2,2	-	-	-	-	1	1
<i>Fusarium culmorum</i> (W.G.Sm.) Sacc.	1	2,2	-	-	-	-	1	1
<i>Fusarium spp.</i>	11	24	7	21	7	31	25	25
<b>Разом фузаріїв</b>	39	86	22	67	16	72	77	77
<i>Penicillium spp.</i>	17	38	16	49	6	27	39	39
<i>Talaromyces luteus</i> (Zukal) Benjamin	2	4,4	5	15	-	-	7	7
<i>Monascus rubber</i> van Tieghem	1	2,2	-	-	-	-	1	1
<i>Phoma exiqua</i> Desmazieres	2	4,4	-	-	-	-	2	2
<i>Acremonium strictum</i>	-	-	-	-	1	4,5	1	1

Перший переважав у регіоні Степу, рідше виділяли у зоні Лісостепу та зрідка на Поліссі. *Aspergillus niger* зустрічався рідше попередніх, хоча в зоні Степу його знаходили в половині досліджених проб, а в зоні Полісся – у третині зразків і зрідка в Лісостепу. *Aspergillus terreus* теж переважав у регіоні Степу, а в інших зонах був ізольований у поодиноких випадках, а єдиний ізолят гриба *Aspergillus ochraceus* був виділений в зерні вівса, вирощеного у зоні Степу.

Фузарії також належать до широко розповсюджених грибів, їх найчастіше знаходили у пробах зерна поліської зони, а також у двох третинах зразків зі степової і лісостепової зон. Серед них домінував вид *F. sporotrichiella* та два його варіанти *var. poae* та *var. tricinctum*, що на Поліссі та в Степу були виділені з двох третин досліджених проб та з третини зразків із Лісостепу. Види *F. moniliforme* та *F. oxysporum* зустрічалися значно рідше, особливо в зоні Лісостепу, більша кількість їх була ізольована із проб степового регіону. Всі інші види були виділені у зразках зерна поліської зони. Пеніцилії зустрічалися у половині досліджуваних проб зерна лісостепового регіону, та дещо рідше в зонах Полісся та Степу.

### **Вивчення токсигенних властивостей виділених грибів**

Токсикологічними дослідженнями за мікробіологічним тестом встановлено, що зі 42 культур фузаріїв токсичними властивостями володіли 14 культур, в тому числі три культури двох видів *F. oxysporum* та *F. moniliforme*, дві – виду *F. sporotrichiella* і одна *F. semitectum*. Чотири культури виду *F. sporotrichiella* та *F. sporotrichiella var. poae*, дві культури *F. moniliforme* і по одній *F. semitectum* і *F. sambucinum* були слаботоксичними, а решта – атоксичними.

Із 74 досліджених культур грибів роду *Fusarium* Т-2 токсин продукували 9, у тому числі по 2 культури грибів виду *F. semitectum*, *F. sporotrichiella* та *F. sporotrichiella var. poae* і по одній культурі грибів *F. sambucinum var. minus*, *F. sporotrichiella var. tricinctum* та *Fusarium spp.*. Три культури двох видів *F. oxysporum* та *F. moniliforme* і *F. moniliforme var. lactis* продукували не ідентифіковані трихотеценові мікотоксини. F-2 токсин (зеараленон) продукували 9 ізолятів чотирьох видів, фузарієву кислоту – 8 культур трьох видів та трьох різновидів, моніліформін – 13 культур трьох видів та одного різновиду і фузарин С – 4 культури двох видів і одного різновиду.

Нами вперше на Україні була встановлена здатність трьох культур *F. moniliforme var. lactis*, по дві *F. oxysporum* і *F. moniliforme* та двох *Alternaria alternata* продукувати фумонізін В $\square$ . Взагалі ж, із 53 встановлених токсин-

продукуючих ізолятів фузаріїв 11 культур синтезували одночасно по декілька видів токсинів: зеараленон, моніліформін, фумонізін (табл.2).

Таблиця 2

**Токсинутворення грибів роду *Fusarium***

Секції, види і різновиди	Дослід- жено культур	З них продукують, кількість культур					
		T-2	F-2	фузарієву кислоту	MON	фузарин С	Фумоні- зін В□
<i>F.avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	1	-	1	1	-	-	нд
<i>F.semitectum</i> Berk. et Rav.	2	2	-	-	1	-	-
<i>F.sambucinum</i> Fuck. var. <i>minus</i>	1	1	-	1	-	-	нд
<i>F.culmorum</i> (W. G. Sm.)sacc	1	-	1	1	-	1	нд
<i>F.sporotrichiella</i>	30	2	-	-	-	-	-
<i>F.sporotrichiella</i> var. <i>poae</i> (Pk)Wr.	10	2	-	3	-	-	нд
<i>F.sporotrichiella</i> var. <i>tricinctum</i>	1	1	-	-	-	-	нд
<i>F.oxysporum</i> (Schlecht.) Snyd. et Hans.	6	1*	2	1	2	-	2
<i>F.moniliforme</i> Sheld	7	1*	5	-	5	1	2
<i>F.moniliforme</i> var. <i>lactis</i> (Pir. et Rib.) Bilai.	5	1*	-	1	5	2	3
<i>Fusarium spp.</i>	10	1	-	-	-	-	-

**Примітка:** «нд» – не досліджували; « - » – не виявлено,

«\*» – не ідентифіковані ТТМТ.

Нами також досліджено 20 культур *A. flavus* на здатність синтезувати афлатоксини з негативним результатом, і лише половина з них продукували коєву кислоту.

З метою виявлення потенційних продуцентів моніліформіну та фумонізинів були проведені дослідження токсичності культуральної рідини 21 ізоляту грибів роду *Fusarium* біопробую. Для цього гриби культивували на 20 мл середовища Чапека-Докса у 50 мл колбах протягом двох тижнів за температури 24 °С та впродовж однієї доби за 4 °С, і культуральну рідину вводили білим мишам внутрішньочервно в дозі 0,5 мл.

Дослідження показали, що культуральна рідина 13 ізолятів, у тому числі семи культур виду *F. moniliforme*, по два *F. oxysporum* і *F. semitectum* та по одному *F. culmorum* і *F. gibbosum* спричинила загибель мишей в перші три доби. Під час гістологічного дослідження серця мишей, загиблих від

культуральної рідини *F. moniliforme*, встановили виражений набряк строми, повнокрів'я судин міокарду та відсутність поперечної посмугованості в кардіоміоцитах, а також надриви та розриви м'язових волокон, а в печінці – гостру застійну гіперемію та гепатит. Аналогічні зміни, за даними ряду дослідників (Kriek N.P.J. et al., 1977; Fan L.L. et al., 1991), відмічені за підгострого токсикозу, викликаного дією моніліформіну та фумонізину В $\square$ .

### **Вивчення впливу факторів зовнішнього середовища на біосинтез токсинів грибом *F. moniliforme* Sheldon та напрацювання фумонізину В $\square$**

Дослідження питань біосинтезу моніліформіну та фумонізину В $\square$  штамми 608/2 та 1170/5 *F. moniliforme* на 10 зернових субстратах показали, що найбільше моніліформіну виявили в зерні пшениці та ячменю, а фумонізину В $\square$  – в зерні пшениці та рису. Дещо менший вміст токсинів був в зерні вівса, гречки, проса та кукурудзи, і токсини не виявляли в зерні сої, насінні соняшнику, а моніліформіну – ще й у горосі.

Щодо впливу вологості, то найкращий синтез моніліформіну відбувався на рисі за вологості від 50 до 70 %, а фумонізину В $\square$  – 50–60 %. За 20 %-ної вологості ріст мікроміцетів не спостерігався, а за 80 %-ної вологості фумонізину В $\square$  не виявлено.

Дослідженням впливу температури на токсиноутворення було встановлено, що температура 24 °С сприяла найкращому росту міцелію, і синтез токсинів обома штамми був найкращим, але штам 1170/5 продукував більше фумонізину В $\square$  ніж штам 608/2. За температури 10 °С ріст грибів був задовільним і продукція токсинів була дещо меншою. За температури 4 та 37 °С ріст був майже непомітним і обидва штами гриба *F. moniliforme* не продукували токсини за температури 37 °С.

Отримані результати були використані для напрацювання фумонізину В $\square$  з метою постановки досліду на курчатах. Для цього штам 1170/5 *F. moniliforme* вирощували на зерні пшениці протягом трьох тижнів у матрацах. Субстрат висушували, подрібнювали та екстрагували сумішшю ацетонітрил-вода (1:1) і розчинник випаровували. Оскільки штам 1170/5 *F. moniliforme* продукував фумонізин В $\square$  і моніліформін, провели їх розподіл виходячи з вивченої хроматографічної рухливості обох токсинів у різних розчинниках. Для цього залишок розчинили в суміші етанол-вода (3:1), в яку переходив лише фумонізин В $\square$ , а моніліформін залишився в екстракті, що було підтверджено методом ТШХ. Окрім того, наявність та кількість фумонізину В $\square$  в розчині підтвердили методом ІФА у хіміко-токсикологічному відділі

Державного науково-дослідного інституту діагностики і ветсанекспертизи м. Київ.

### Вивчення впливу фумонізину В<sub>1</sub> на організм курчат та протективної дії мікосорбу

У досліді були використані 3 групи курчат п'ятитижневого віку по 10 голів у кожній, живою масою  $208 \pm 3$  грами. Курчатам першої групи щоденно задавали перорально по 8,0 мг фумонізину В<sub>1</sub> у 5 %-ному водному етанолі, курчата другої групи отримували таку ж дозу токсину і мікосорб у кількості 2 % на кілограм корму, курчата контрольної групи отримували лише комбікорм. У птахів, що споживали фумонізин В<sub>1</sub>, спостерігали незначне пригнічення та періодичне розрідження калових мас. У курчат, які отримували токсин і мікосорб, починаючи з другого тижня, встановлювали дещо більші середньодобові прирости у порівнянні з контрольною групою.

Біохімічними дослідженнями крові курчат встановлено, що активність загальної лужної фосфатази під впливом фумонізину В<sub>1</sub> спочатку досліді дещо знизилася і становила  $679,6 \pm 38,6$  Од/л. Наприкінці другого тижня вона зросла до  $1003 \pm 22,7$  Од/л за рахунок кісткового ізоферменту ( $736,6 \pm 15,84$  Од/л), а потім знову зменшилась до  $667,3 \pm 22,1$  Од/л. У курчат, що отримували токсин і мікосорб, зміни носили аналогічний характер, але вони були значно слабше виражені, тоді як у контрольній групі відмічали поступове підвищення активності ферменту (рис. 1А).

Активність кишкового ізоферменту у курчат дослідних груп в кінці першого тижня була вдвічі нижча ( $100,6 \pm 9,0$  Од/л), а впродовж другого і третього тижнів зросла відповідно до  $269,6 \pm 12,6$  та  $283,6 \pm 24,7$ , а у птиць, що отримували мікосорб, – до  $136,3 \pm 15,27$  та  $188,6 \pm 19,2$  Од/л. У курчат контрольної групи встановлювали поступове зниження активності з  $199,6 \pm 19,0$  до  $122,3 \pm 2,6$  Од/л на кінець досліді (рис. 1В).

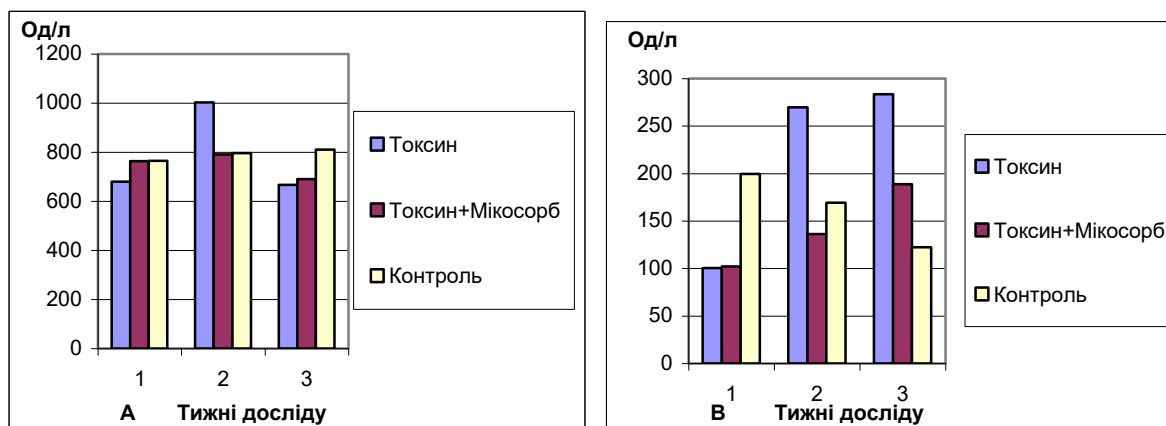


Рис. 1 – Зміни активності загальної лужної фосфатази (А) та кишкового ізоферменту (В) під впливом фумонізину В<sub>1</sub>

Під дією токсину активність кислій фосфатази спочатку трохи підвищувалась, а в кінці дослідження знизилась, але ці зміни були статистично не достовірними, тоді, як у контрольній групі протягом дослідження відмічали поступове вірогідне підвищення активності ферменту з  $8,02 \pm 0,1$  Од/л до  $12,6 \pm 0,54$  Од/л ( $P < 0,05$ ).

Активність загальної лактатдегідрогенази (ЛДГ) у групах курчат під дією токсину достовірно зростала ( $P < 0,01$ ) протягом усього дослідження до  $424 \pm 8,7$ – $499,3 \pm 5,4$  Од/л, тоді як у контрольній групі активність не підвищувалась і була на рівні  $335 \pm 23,6$ – $380 \pm 14,8$  Од/л.

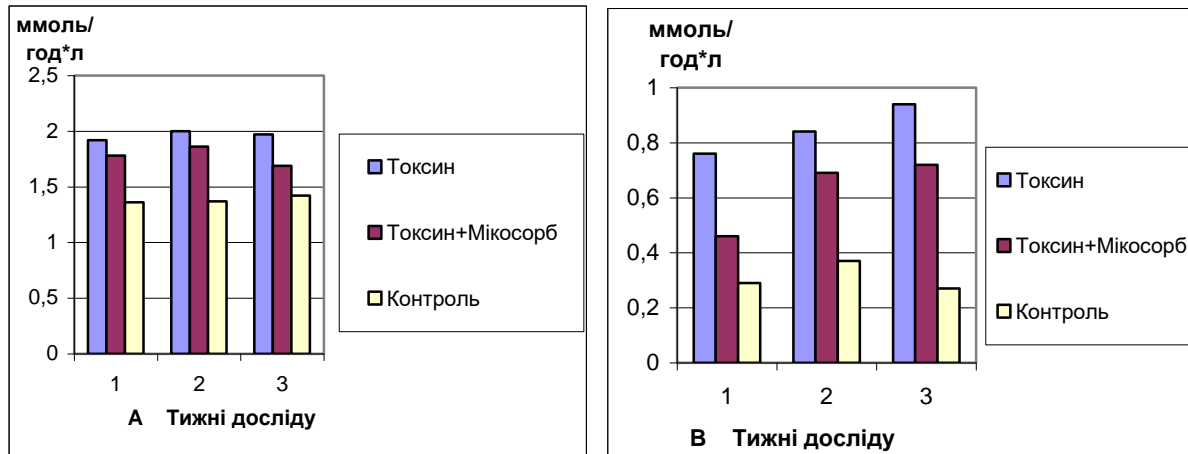


Рис. 2 – Зміни активності АСТ (А) і АЛТ (В) під дією фумонізіну В<sub>1</sub>

Фумонізин В<sub>1</sub> зумовив достовірне підвищення активності аспарагінової трансферази (АСТ) у курчат дослідної групи до  $1,92 \pm 0,08$ – $2,0 \pm 0,08$  ммоль/год×л, хоч мікосорб трохи зменшував вплив токсину до  $1,69 \pm 0,07$ – $1,86 \pm 0,04$  ммоль/год×л, тоді як у контрольній групі активність була в межах  $1,36 \pm 0,14$ – $1,42 \pm 0,05$  ммоль/год×л (рис. 2А). Особливо значно підвищувалась під дією токсину активність аланінової трансферази (АЛТ) до  $0,76 \pm 0,08$ – $0,94 \pm 0,04$  ммоль/год×л і меншою мірою у курчат, що отримували мікосорб – до  $0,46 \pm 0,04$ – $0,72 \pm 0,1$  ммоль/год×л, а у контрольній групі активність була в межах  $0,29 \pm 0,07$ – $0,27 \pm 0,02$  ммоль/год×л (рис. 2 В).

Уміст сечовини і креатиніну під дією токсину достовірно ( $P < 0,01$ ) підвищувався протягом усього дослідження відповідно до  $1,72 \pm 0,11$ – $1,82 \pm 0,13$  ммоль/л та  $132,3 \pm 6,4$ – $140,3 \pm 8,5$  ммоль/л. Використання мікосорбу знижувало ступінь зростання до  $1,36 \pm 0,04$ – $1,56 \pm 0,12$  та  $104,9 \pm 6,5$ – $114,4 \pm 15,5$  ммоль/л. Концентрація загального, ультрафільтрованого, нейтрального та білокзв'язаного кальцію, неорганічного фосфору та загального магнію в сироватці крові курчат під дією фумонізіну В<sub>1</sub> була дещо нижчою у порівнянні з контрольною групою.

Під час гістологічного дослідження печінки курчат, що отримували токсин, встановлювали множинні та досить великі казеозні некрози, які



займали в окремих місцях до  $\frac{1}{3}$  –  $\frac{1}{4}$  печінкової часточки та містили білково-жировий детрит. По всій структурі некрозу виявляли поодинокі епітеліоїдні клітини, що свідчили про заміщення некротичної маси ретикулярною тканиною. У печінці курчат, які отримували токсин і мікосорб, виявляли лише поодинокі некрози, в яких казеозна некротична маса поступово заміщувалась молодими ретикулярними клітинами.

Отже, під дією фумонізину В<sub>1</sub> у курчат розвивався гепатит, що переходив в гепатоз, та порушувався мінеральний обмін, а використання мікосорбу покращувало біохімічні показники та зменшувало негативний вплив токсину на печінку курчат.

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

Мікологічні дослідження під час діагностики фузаріотоксикозів передбачають виділення культур грибів і встановлення їх токсичності. З цією метою фузарії культивують протягом місяця на зернових субстратах, що займає багато часу, тому була поставлена мета – розробити експресний варіант дослідження зеараленонпродукуючої здатності фузаріїв. Нами були апробовані 8 живильних середовищ, до складу яких входили у різному співвідношенні глютамінова кислота, пептон, дріжджовий екстракт, середовище Чапека та сусло-агар, а також 3 режими культивування (12 діб за t° 24 °C та 3 доби за 4 °C, 8 діб за 24 °C та 4 доби за 4 °C і 7 діб за t° 24 та 3 доби за t° 4 °C). Дослідженням встановлено, що оптимальним середовищем для накопичення зеараленону виявився сусло-агар із глютаміновою кислотою (10 г/л) та агар Чапека, а режим культивування – 8 діб за 24 °C та 4 доби за 4 °C. Шість культур фузаріїв (4 *F. graminearum* та по одній *F. culmorum* і *F. sporotrichiella* v. *proae*), які вирощували в пробірках на сусло-агарі з глютаміновою кислотою, показали повний збіг результатів під час дослідження класичним і розробленим методами. Проведене порівняльне дослідження 14 культур гриба *F. moniliforme*, з яких 5 виявилися продуцентами зеараленону. Таким чином, був значно скорочений термін дослідження фузаріїв до 12 діб і відпала необхідність вирощування їх на зерновому субстраті.

На розроблений експрес-метод визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати зеараленон був отриманий деклараційний патент на корисну модель № u 200508728 від 15.02.2006.

## ВИСНОВКИ

1. У дисертації наведені результати вивчення кількісного та якісного складу епіфітної та ендоепіфітної мікобіоти зерна вівса урожаю 2004 та 2005 рр. з різних фізико-географічних регіонів України, виявлені продуценти Т-2 токсину, зеараленону, фумонізіну В<sub>1</sub>, моніліформіну, фузарину С, фузарієвої та коєвої кислот. Експериментально встановлені оптимальні умови біосинтезу фумонізіну В<sub>1</sub> та моніліформіну грибом *Fusarium moniliforme*, вивчено вплив цих токсинів на організм білих мишей та фумонізіну В<sub>1</sub> на організм курчат і встановлено протективну дію мікосорбу.

2. В одному грамі зерна вівса урожаю 2004 та 2005 років кількість колонієутворювальних одиниць (КУО) грибів коливалась від  $1,8 \cdot 10^3$  до  $8,7 \cdot 10^4$  і в середньому становила  $1,78 \cdot 10^4 \pm 4,55 \cdot 10^3$ . При цьому у 2004 році кількість КУО становила  $2,16 \cdot 10^4 \pm 8,1 \cdot 10^3$ , а у 2005 році –  $1,5 \cdot 10^4 \pm 2,6 \cdot 10^3$ , що свідчить про відсутність суттєвої різниці.

3. Зі 100 зразків зерна виділено 562 культури грибів, віднесених до 2-х класів 9 родів, 418 з яких були ідентифіковані і представлені 16-ма видами і 4-ма різновидами. Найчастіше на зерні вівса виявлялися гриби родів *Alternaria*, *Aspergillus*, *Mucor* та *Fusarium*. На Поліссі переважали гриби родів *Alternaria* та *Fusarium*; в регіонах Лісостепу та Степу родів *Mucor* та *Aspergillus*, а також в останньому фузарії.

4. Із токсикологічно досліджених 74 культур фузаріїв 53 володіли токсигенними властивостями: у тому числі по 9 ізолятів продукували Т-2 токсин і зеараленон, 8 – фузарієву кислоту, 13 – моніліформін, 7 – фумонізин В<sub>1</sub> та 4 – фузарин С. Вперше на Україні встановлена здатність *F. moniliforme*, *F. moniliforme* var. *lactis*, *F. oxysporum* та *Alternaria alternata* продукувати фумонізин В<sub>1</sub>.

5. Найкращим з 10 досліджених зернових субстратів для синтезу моніліформіну грибом *F. moniliforme* виявились зерна рису та ячменю вологістю від 50 до 70 %, у процесі культивування 21 добу за температури 24 °С, а фумонізіну В<sub>1</sub> – зерна пшениці, рису та вівса з вологістю 50–60 %, у ході культивування 14 діб за 24 °С та 7 діб за 4 °С, або 21 добу за 24 °С. Токсини не виявляли в зерні сої і соняшнику, а моніліформіну – ще й на зерні гороху.

6. Культуральна рідина 13 ізолятів фузаріїв із 21 дослідженого, у тому числі семи культур виду *F. moniliforme*, по два *F. oxysporum* і *F. semitectum* та по одному *F. culmorum* і *F. gibbosum*, викликала загибель мишей у перші три доби. В міокарді та печінці встановлено зміни, притаманні дії моніліформіну та фумонізіну В<sub>1</sub>.

7. Пероральне введення п'ятитижневим курчатам фумонізину В<sub>1</sub> у дозі 8 мг на голову впродовж трьох тижнів призводило до ураження печінки, міокарда та нирок.

8. Включення в раціон курчат мікосорбу в кількості 2 % на кілограм корму, зменшує негативний вплив токсину.

9. Розроблений метод дослідження зеараленонпродукуючих властивостей культур *Fusarium spp.* шляхом вирощування їх на сушло-агарі з глютаміною кислотою протягом 8 діб за 24°C і 4 доби за 4 °C, без культивування на зернових субстратах скорочує дослідження до 12 діб (новизна методу підтверджена деклараційним патентом на корисну модель № u 200508728).

### ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Контамінацію зерна вівса продуцентами Т-2 токсину, зеараленону, фумонізину В<sub>1</sub>, моніліформіну, фузарину С, фузарієвої та коєвої кислот враховувати під час постановки діагнозу на мікотоксикоз.

2. У випадку ураження зерна вівса грибами *Fusarium moniliforme* та *Alternaria alternata* досліджувати зерно на наявність фумонізину В<sub>1</sub>, а культури – на здатність синтезувати цей мікотоксин.

3. З метою скорочення терміну мікотоксикологічного дослідження використовувати розроблений експрес-метод визначення здатності грибів *Fusarium spp.* продукувати зеараленон (деклараційний патент на корисну модель № u 200508728) скорочує термін дослідження.

4. Для зменшення негативного впливу фумонізину В<sub>1</sub> на організм курчат використовувати мікосорб із розрахунку 2 % на кілограм корму.

5. Матеріали дисертаційної роботи використовуються у навчальному процесі з курсів “Ветеринарна мікробіологія” і “Ветеринарна токсикологія” під час підготовки фахівців ветеринарної медицини, для підвищення кваліфікації слухачів післядипломної освіти та в науково-дослідній роботі.

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1) Жила І.А., Рухляда В.В., Білан А.В. Зміни морфологічного та біохімічного складу крові коней при хронічному фузаріо-Т-2-токсикозі // Вісник Білоцерківського ДАУ. – Біла Церква, 2007. – Вип.44. – С. 51–54. (Дисертант опрацював результати та оформив статтю).

2) Рухляда В.В., Білан А.В., Соколова О.В. Розповсюдження мікроміцетів на зерні вівса у різних регіонах України // Вісник Білоцерківського ДАУ. – Біла Церква, 2007. – Вип.44. – С. 146–150.

(Дисертант провів експериментальні дослідження, опрацював результати та оформив статтю).

3) Рухляда В.В., Андрійчук А.В., Білан А.В. Розробка способу експресного визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати зеараленон // Наук. вісн. НАУ – К., 2007. – С. 130–133. (Дисертант провів експериментальні дослідження).

4) Рухляда В.В., Білан А.В., Соколова О.В. Поширення грибів роду *Fusarium* Lk:Fr та продуцентів фузаріотоксинів на зерні вівса в різних регіонах України // Бюл. “Ветеринарна біотехнологія” ІВМ – К., 2007. – Вип.11. – С. 204–211. (Дисертант провів експериментальні дослідження, опрацював результати та оформив статтю).

5) Білан А.В. Вплив факторів зовнішнього середовища на біосинтез моніліформіну та фумонізіну В<sub>1</sub> грибом *Fusarium moniliforme* Sheldon // Вісник Білоцерківського ДАУ. – Біла Церква, 2007. – Вип.48. – С. 14–17.

6) Рухляда В.В., Білан А.В., Утеченко М.В. та ін. Вивчення впливу фумонізіну В<sub>1</sub> на організм курчат і протективної дії мікосорбу // Вісник Білоцерківського ДАУ. – Біла Церква, 2008. – Вип.51. – С. 72–78. (Дисертант провів експериментальні дослідження, опрацював результати та оформив статтю).

7) Пат. UA, 12712C12N 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 та оформив деклараційний патент України на винахід).

#### АНОТАЦІЯ

**Білан А.В. Мікроміцети зерна вівса, їх токсигенні властивості та вплив фумонізіну В<sub>1</sub> на курчат.** – Рукопис. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія. – Одеський державний аграрний університет. – Одеса, 2009.

У дисертації наведені результати вивчення кількісного та якісного складу епіфітної та ендоефітної мікобіоти зерна вівса урожаю 2004 та 2005 рр. з різних фізико-географічних регіонів України. Кількість колонієутворювальних одиниць (КУО) грибів коливалась від  $1,8 \cdot 10^3$  до  $8,7 \cdot 10^4$  і в середньому становила  $1,78 \cdot 10^4 \pm 4,55 \cdot 10^3$ . Зі 100 зразків зерна вівса виділено 562 культури грибів, віднесених до 2-х класів 9 родів, 418 з яких ідентифіковані і представлені 16-ма видами і 4-ма різновидами. Найчастіше виявлялися гриби родів *Alternaria*, *Aspergillus*, *Mucor* та *Fusarium*. На Поліссі переважали гриби родів *Alternaria* та *Fusarium*; в регіонах Лісостепу та Степу родів *Mucor* та *Aspergillus*, а також в останньому фузарії. Із 74 культур фузаріїв 53 володіли токсигенними властивостями: по 9 ізолятів з

яких продукували Т-2 токсин і зеараленон, 8 – фузарієву кислоту, 13 – моніліформін, 7 – фумонізін В<sub>1</sub> та 4 – фузарин С. Вперше на Україні була встановлена здатність *F. moniliforme*, *F. moniliforme var. lactis*, *F. oxysporum* та *Alternaria alternata* продукувати фумонізін В<sub>1</sub>. Найкращим субстратом для синтезу моніліформіну грибом *F. moniliforme* виявились зерна рису та ячменю вологістю від 50 до 70 %, за культивування 21 добу за температури 24 °С, а фумонізину В<sub>1</sub> – зерна пшениці, рису та вівса з вологістю 50–60 %. Токсини не виявляли на зерні сої і соняшнику, а моніліформін – ще й на зерні гороху. Культуральна рідина 13 ізолятів фузаріїв із 21 дослідженого була токсичною для білих мишей, у міокарді та печінці загиблих від *F. moniliforme* встановлено зміни, притаманні дії моніліформіну та фумонізину В<sub>1</sub>. Пероральне введення п'ятитижневим курчатам фумонізину В<sub>1</sub> у дозі 8 мг/гол упродовж трьох тижнів призводило до ураження печінки, міокарда і нирок та порушення фосфорно-кальцієвого та D-вітамінного обміну. Включення в раціон курчат мікосорбу в кількості 2 % на кілограм корму зменшує негативну дію токсину. Розроблений експрес-метод дослідження зеараленонпродукуючих властивостей культур *Fusarium spp.* скорочує дослідження до 12 діб, (новизна методу підтверджена деклараційним патентом на корисну модель № у 200508728).

**Ключові слова:** мікроміцети, мікотоксини, токсичність, біосинтез, моніліформін, фумонізін В<sub>1</sub>, субстрат, середовище, мікосорб.

## АННОТАЦІЯ

**Билан А.В. Микромицеты зерна овса их токсигенные свойства и влияние фумонизина В1 на цыплят. – Рукопись.** Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология и вирусология. – Одесский государственный аграрный университет. – Одесса, 2009.

Диссертация посвящена изучению распространения микромицетов на зерне овса из различных регионов Украины, установлению их токсичности и видов токсинов продуцируемых, оптимизации условий, способствующих активному биосинтезу монилиформина и фумонизина В<sub>1</sub>, изучению влияния токсинов на мышей и цыплят, протективного действия микосорба при фумонизин-токсикозе цыплят, а также разработке экспрес-метода определения продуцентов зеараленона. Исследованиями установлено, что в 1 грамме зерна овса урожая 2004 и 2005 годов количество колониеобразующих единиц (КОЕ) грибов колебалось от  $1,8 \cdot 10^3$  до  $8,7 \cdot 10^4$  и в среднем составляло  $1,78 \cdot 10^4 \pm 4,55 \cdot 10^3$ . Из 100 образцов зерна выделено 562 культуры грибов, отнесенных к 2-м классам 9 родов, 418 из которых идентифицированы и представлены 16-ю видами и 4-мя разновидностями. Наиболее часто выделялись грибы родов *Alternaria*, *Aspergillus*, *Mucor* и *Fusarium*. На Полесье преобладали грибы родов *Alternaria* та *Fusarium*; в регионах Лесостепи и Степи – родов *Mucor* и *Aspergillus*, а также в последнем фузарии. Из 74 исследованных культур фузариев – 53 были токсичными; по 9 изолятов из которых продуцировали Т-2 токсин и зеараленон, 8 – фузаровую кислоту, 13 – монилиформин, 7 – фумонизин В<sub>1</sub> и 4 – фузарин С. Впервые в Украине установлена способность *F. moniliforme*, *F. moniliforme var. lactis*, *F. oxysporum* и *Alternaria alternata* продуцировать фумонизин В<sub>1</sub>. Наилучшим субстратом для синтеза монилиформина грибом *F. moniliforme* оказались зёрна риса и ячменя влажностью от 50 до 70 %, с культивированием 21 сутки при температуре 24 °С, а фумонизина В<sub>1</sub> – зёрна пшеницы, риса и овса влажностью 50–60 %. Токсини не выявлены на зерне сои и подсолнуха, а монилиформин – ещё и на зерне гороха. Культуральная жидкость 13 изолятов из 21 исследованного вызывала гибель белых мишей, в миокарде и печени павших от *F. moniliforme* установлены изменения,

характерные для действия монилиформина и фумонизина В<sub>1</sub>. Пероральное введение пятидневным цыплятам фумонизина В<sub>1</sub> в дозе 8 мг на голову на протяжении трёх недель приводило к поражению печени, миокарда и почек, а также нарушению фосфорно-кальциевого и D-витаминного обмена. Скармливание цыплятам микосорба в количестве 2 % на килограмм корма, снижало негативное влияние токсина. Разработанный экспресс-метод исследования зearаленонпродуцирующих культур *Fusarium spp.*, сокращает исследование до 12 суток, (новизна метода подтверждена декларационным патентом на полезную модель № u 200508728).

**Ключевые слова:** микромицеты, микотоксины, токсичность, биосинтез, монилиформин, фумонизин В<sub>1</sub>, субстрат, среда, микосорб.

## ANNOTATION

**Bilan A.V. Mikromycetes corns of oat of their toxigenic property and influencing of fumonisin B<sub>1</sub> on chickens. – Manuscript.** The dissertation on competition of a scientific degree of the candidate of veterinary sciences on specialty 16.00.03 – veterinary microbiology and virology. – Odessa State Agrarian University. – Odessa, 2009.

The dissertation is devoted distribution studying micromycetes on grain of oats from various regions of Ukraine, to an establishment of their toxicity and kinds of toxins produced, optimisation of the conditions promoting active biosynthesis moniliformin and fumonisin B<sub>1</sub>, studying of influence of toxins on mice and chickens, protective action mykosorb at a fumonizintoxicosis of chickens, and also working out of an express method of definition of producers zearalenon. By researches it is established that in 1 gramme of grain of oats of a crop 2004 and 2005 the quantity mushrooms fluctuated from  $1,8 \cdot 10^3$  to  $8,7 \cdot 10^4$  and in constituted  $1,78 \cdot 10^4 \pm 4,55 \cdot 10^3$ . From 100 samples of grain 562 cultures of the mushrooms carried to 2nd classes of 9 sorts are allocated, 418 from which are identified and presented by 16 kinds and 4 versions. Mushrooms of sorts *Alternaria*, *Aspergillus*, *Mucor* and *Fusarium* were most often allocated. To Polesye mushrooms of sorts *Alternaria* that *Fusarium* prevailed; In Forest-steppe and Steppe regions – sorts *Mucor* and *Aspergillus*, and also in last fusarium. From 74 investigated cultures fusarium – 53 were toxic; on 9 cultures from which produced T-2 toxin and zearalenon, 8 – fusaric acid, 13 – moniliformin, 7 – fumonisin B<sub>1</sub> and 4 – fusarin C. First in Ukraine is established ability *F. moniliforme*, *F. moniliforme var. lactis*, *F. oxysporum* and *Alternaria alternata* to produce fumonisin B<sub>1</sub>. The best substratum for synthesis moniliformin mushroom *F. moniliforme* have appeared on grain rice and barley humidity from 50 to 70 %, with cultivated 21 days at the temperature of 24 °C, and fumonisine B<sub>1</sub> – grain wheat, rice and an oats humidity of 50–60 %. Toxins are not revealed on soya and sunflower grain, and moniliformin – and on peas grain. The cultural liquid 13 from 21 investigated caused destruction white maus, in a myocardium and a liver fallen from *F. moniliforme* changes, characteristic for action moniliformine and fumonisine B<sub>1</sub> are established. Introduction to five-week chickens fumonisine B<sub>1</sub> in a dose of 8 mg on a head on an extent three led weeks to defeat of a liver, a myocardium and kidneys, and also infringement D-vitamin exchange. Introduction to chickens mykosorb in number of 2 % on forage kg, reduced negative influence of toxin. The developed express method of research to product zearalenon qualities of cultures *Fusarium spp.*, reduces research till 12 days, (novelty of a method is confirmed patent by the declarative for useful model № u 200508728).

**Keywords:** micromycetes, mikotoxins, toxycity, biosynthesis, moniliformin, fumonisin B<sub>1</sub>, medium, mykosorb.