

**ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**БЛИК СЕРГІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ**

**УДК 619:615.918:633.15:582.28**

**МІКОБІОТА ЗЕРНА КУКУРУДЗИ ТА ТОКСИГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ  
ГРИБІВ РОДІВ FUSARIUM LINK I ASPERGILLUS MICHELI**

**16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

Одеса -2006

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі мікробіології та вірусології Білоцерківського державного аграрного університету Міністерства аграрної політики України

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

**Офіційні опоненти:** доктор ветеринарних наук, професор  
**Ковальов Василь Львович,**  
Південний філіал “Кримський державний  
агротехноло-  
гічний університет “ Національного аграрного  
універси-  
тету, завідувач кафедри епізоотології, паразитології та  
ветсанекспертизи

кандидат ветеринарних наук, старший науковий  
співробітник, член-кореспондент УААН

**Ображей Анатолій Федорович,**  
Інститут ветеринарної медицини УААН, директор

**Провідна установа** – Національний аграрний університет, м. Київ

Захист відбудеться “6” жовтня 2006 року о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 41.372.01 в Одеському державному аграрному університеті за адресою: 65039, м. Одеса, вул. Канатна, 99.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Одеського державного аграрного університету за адресою: 65039, м. Одеса, вул. Канатна, 99.

Автореферат розісланий 28 серпня 2006 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради

С.І.Масленікова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Кукурудза є однією з найбільш цінних кормових культур і в годівлі сільськогосподарських тварин використовують зелену масу рослин та зерно, продукти переробки якого широко застосовуються і в харчуванні людей. Кукурудза, як і інші кормові культури завжди контамінована різноманітними мікроорганізмами, в тому числі і мікроскопічними грибами. Кількість останніх значно збільшується в період вегетації та дозрівання в умовах підвищеної вологості або при порушенні умов зберігання зерна. Серед мікобіоти кукурудзи зустрічаються і токсигенні види грибів, які, окрім псування зерна, призводять до накопичення в них мікотоксинів, в кількостях небезпечних для здоров'я тварин і людей (Саркисов А.Х. и др., 1948; Погребняк Л.И., Брянская А.И., Ображей А.Ф. и др., 1978; Харченко С.Н., 1988; Leeson S et al., 1995; Hollinnger K.G., Ekpergin H.E., 1999). Мікотоксини – вторинні метаболіти грибів, які, окрім токсигенних властивостей, володіють імуносупресуючою, мутагенною, тератогенною і канцерогенною діями (Тутельян В.А., Кравченко Л.В., 1985).

Видовий склад мікобіоти кукурудзи представлений різними мікроскопічними грибами (Пидопличко Н.М., 1953) і детально вивчався дослідниками в Молдавії (Балабанов В.А., 1966), Ростовській області (Башмакова Е.В., 1963), Грузії (Квачадзе Л.Д., 1970), Єгипті (Мухамед Н.Х., 1975) та Болгарії (Кръстев Е., Христов Б., 1981). В Україні в останні роки з'явилося повідомлення про мікобіоту зерна кукурудзи у зв'язку з вивченням токсичних властивостей різних видів фузаріїв (Рухляда В.В., Элланская И.А., Кулинич Н.Н., 1995). В більшості публікацій відмічено, що на зерні кукурудзи часто зустрічаються представники токсигенних видів грибів родів *Fusarium* та *Aspergillus*.

Гриби роду *Fusarium* здатні продукувати різноманітні фузаріотоксини, серед яких головне місце займають такі як Т-2 токсин, зеараленон, моніліформін та інші, з якими пов'язані захворювання людей та сільськогосподарських тварин. Токсини грибів роду *Aspergillus* в отруєнні людей і тварин займають не менше місце.

Дані щодо розповсюдження грибів на зерні кукурудзи та їх токсигенні властивості в Україні обмежені, тому напрям дисертаційної роботи можна вважати актуальним.

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

**Мета і завдання дослідження.** Мета дисертаційної роботи – вивчення розповсюдження грибів зерна кукурудзи різних регіонів України, визначення токсичних властивостей грибів родів *Fusarium* і *Aspergillus* та видів токсинів, що вони продукують, а також дослідження впливу факторів навколишнього середовища на біосинтез Т-2 токсину грибом *Fusarium sambucinum* та розробка експрес-методу визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати Т-2 токсин.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

- визначити кількісний та якісний склад мікобіоти зерна кукурудзи різних регіонів України урожаїв 2000, 2001 та 2002 років;
- провести видову ідентифікацію виділених мікроміцетів, встановити їх токсичні властивості та види мікотоксинів, що продукують гриби родів *Fusarium* і *Aspergillus*;
- вивчити вплив факторів навколишнього середовища на біосинтез Т-2 токсину грибом *F. sambucinum*;
- розробити експрес-метод визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати Т-2 токсин.

*Об'єкт дослідження* – зерно кукурудзи різних регіонів України.

*Методи дослідження:*

- мікологічні – комплекс методів, які застосовуються з метою виділення або ідентифікації грибів у досліджуваному матеріалі;
- мікотоксикологічні – методи, що використовуються для визначення токсинів грибів;
- математично-статистичний аналіз з метою обґрунтування кількісної оцінки отриманих експериментальних даних.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вивчений кількісний та якісний склад мікобіоти зерна кукурудзи різних регіонів України та встановлена здатність грибів роду *Fusarium* продукувати фузаріотоксини (Т-2 токсин, F-2 токсин (зеараленон) та моніліформін) і токсичність деяких видів грибів роду *Aspergillus*. Вперше виявлена здатність продукувати Т-2 токсин грибом *F. sambucinum* та досліджено вплив факторів навколишнього середовища (вид субстрату, температура, вологість, термін культивування) на біосинтез токсину. Розроблений експрес-метод визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати Т-2 токсин, на який отримано деклараційний патент на корисну модель “Спосіб експресного визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати Т-2 токсин” (деклараційний патент на винахід №4794 від 15.02.2006).

**Практичне значення одержаних результатів.** Встановлена забрудненість зерна кукурудзи України грибами роду *Fusarium*, що виробляють різні фузаріотоксини (Т-2 токсин, F-2 токсин та моніліформін).

Вперше виділено новий продуцент Т-2 токсину – гриб *F. sambucinum* і досліджено вплив на його біосинтез виду субстрату, температури, вологості та терміну культивування.

Розроблений експрес-метод визначення здатності грибів роду *Fusarium* виробляти Т-2 токсин придатний для застосування у лабораторіях ветеринарної медицини країни та наукових установах при діагностиці фузаріотоксикозів сільськогосподарських тварин.

**Особистий внесок дисертанта.** Усі матеріали дисертації одержані власними дослідженнями автора. Дисертант брав безпосередню участь у розробці методики досліджень, підборі літературних джерел, особисто виконував експериментальні дослідження, провів статистичну обробку та аналіз одержаних результатів, обґрунтування висновків, підготовку публікацій. Вибір напрямку досліджень, написання дисертації та автореферату здійснено самостійно за допомоги наукового керівника.

Дослідження видової ідентифікації грибів роду *Fusarium* проведені дисертантом у відділі фізіології і систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України спільно з кандидатами біологічних наук І.О. Еланською та О.В. Соколовою.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертації доповідалися на засіданнях ради ветеринарного факультету БДАУ (2000–2005 рр.), науковій конференції докторантів і аспірантів “Тиждень науково-дослідної роботи молодих учених та студентської молоді” (БДАУ, м. Біла Церква, 2002 р.), 3-й міжвузівській науково-практичній конференції аспірантів “Сучасна аграрна наука: напрями досліджень, стан і перспективи” (Вінницький державний аграрний університет, м. Вінниця, 2003 р.), науковій конференції докторантів і аспірантів “Наукові пошуки молоді на початку ХХІ століття”, що відбулася в БДАУ (м. Біла Церква, 2003 р.), науково-практичній конференції “Сучасні проблеми ветеринарної медицини” (БДАУ, м. Біла Церква, 2003 р.), 2-й конференції молодих учених, докторантів, аспірантів “Наукові пошуки молоді на початку ХХІ століття”, (БДАУ, м. Біла Церква, 2004 р.), науково-практичній конференції “Сучасні проблеми ветеринарної медицини” (БДАУ, м. Біла Церква, 2005 р.).

**Публікації.** За матеріалами дисертації надруковано 5 наукових статей у фахових виданнях, а саме: три статті у віснику БДАУ (2002, 2005 рр.) та дві у бюлетні “Ветеринарна біотехнологія” (2003–2004 рр.), в яких відображено основний зміст дисертації та отриманий патент.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, загальної методики та основних методів дослідження, результатів досліджень та їх обговорення, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел і додатків.

Дисертація викладена на 103 сторінках комп'ютерного набору, містить 19 таблиць, 18 рисунків. Список використаної літератури включає 206 джерел, із яких 82 – іноземних авторів.

## МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Робота виконувалась упродовж 2000–2005 рр. у науково-дослідній лабораторії кафедри мікробіології та вірусології Білоцерківського державного аграрного університету.

Матеріалом мікологічних досліджень були 90 проб зерна кукурудзи, відібраних у 2000–2002 рр. в колгоспах, агрофірмах та приватних підприємствах із 10 областей України: Київської, Вінницької, Житомирської, Кіровоградської, Херсонської, Одеської, Харківської, Миколаївської, Дніпропетровської та Донецької в період зберігання. Зразки середніх проб відбирали відповідно до діючих державних стандартів (ГОСТ 13586, 3–83). З метою проведення діагностичних досліджень із зерна кукурудзи сумнівної якості відбирали проби із місць з найбільш вираженими ознаками ураження.

Виділено та ідентифіковано за видовою приналежністю 527 культур грибів, токсикологічно досліджено 64 культури грибів роду *Fusarium* та 169 роду *Aspergillus*.

Для виявлення загальної мікобіоти зерно пінцетом по 6–7 штук розкладали в чотири бактеріологічні чашки з середовищем Чапека. З метою виявлення глибинної мікобіоти зерно протравлювали 3-відсотковим розчином формаліну і промивали стерильною водою, ділили надвоє і розкладали в чотири чашки з середовищем Чапека по 5–8 штук. Посіви культивували по дві чашки при 24 та 37 °С протягом тижня. Для отримання чистих культур, починаючи з 3-го дня росту, гриби відсівали на скошене середовище Чапека.

З метою вивчення кількісного складу мікобіоти зерно подрібнювали і готували серійні розведення. Для цього наважку подрібненого зерна масою 10 г заливали до 100 мл стерильною водою і струшували протягом 15–20 хвилин. Із отриманого розведення готували послідовні розведення в пробірках 1:100, 1:1000 та 1:10000, з яких у стерильні чашки Петрі вносили по 1 мл суспензії, заливали 15 мл розплавленого і охолодженого до 45 °С агару Чапека і перемішували коловими рухами. Кожне розведення висівали в 4 чашки і по дві інкубували при 24 та 37 °С. На 3–5-й день росту проводили підрахунок кількості колоній грибів та визначали вміст діаспор грибів в

одному грамі корму. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за І.А. Ашмаріним і А.А. Ворбйовим (1962).

Ідентифікацію виділених грибів проводили за допомогою визначників грибів Н.М. Підоплічка (1946, 1953, 1977), В.И. Билай (1977). Для видової ідентифікації грибів роду *Fusarium*, що не утворювали конідій, застосовували метод мікрокультури (Билай В.И., Элланская И.А., 1983). Розміри конідій і міцелію грибів визначали мікроскопією роздавленої краплі на середньому збільшенні (40 х), а в деяких випадках в імерсійній системі (90 х) за допомогою окуляр-мікрометра.

Визначення видової належності виділених грибів роду *Fusarium* проводили у відділі фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за участю кандидатів біологічних наук І.О. Еланської та О.В. Соколової, яким автор висловлює щире подяку.

Токсичність 64 штамів грибів роду *Fusarium* досліджували мікробіологічним методом (Рухляда В.В., Башмакова Е.В., 1988), який базується на встановленні пригнічення росту чутливого тест-мікроорганізму – *Candida pseudotropicalis* штам

44 ПК токсином грибів. Використовували два варіанти: метод паперових дисків та агарових блоків. Оцінку токсичності грибів проводили на підставі розміру зон пригнічення росту тест-мікроорганізму навколо дисків або блоків: слаботоксичні гриби утворювали зони затримки діаметром – до 15 мм, токсичні – більше 16 мм і нетоксичні – зон не утворювали.

40 культур грибів роду *Fusarium*, що мали токсичні властивості та пригнічували ріст тест-культури *Candida pseudotropicalis* штам 44 ПК, досліджували на здатність виробляти Т-2 токсин, НТ-2 токсин, діацетоксисцирпенол і неосоланіол. Кількісний уміст Т-2 токсину в культурах грибів визначали розробленим нами способом експресного визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати Т-2 токсин (Рухляда В.В. та ін., 2005). У виявленого вперше нового продуцента Т-2 токсину гриба *F. sambucinum* (шт. 814/61 та 824/7) досліджували потенційну здатність продукувати цей токсин на різних видах рослинних субстратів та з'ясовували вплив факторів навколишнього середовища (температура, вологість та тривалість інкубування) на цей процес.

Кількісний уміст Т-2 токсину в культурах грибів визначали модифікованим методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) з біоавтографією (Рухляда В.В., 1998).

Для вивчення впливу факторів навколишнього середовища на біосинтез Т-2 токсину використовували *F. sambucinum* штам 824/7. У

зволожені зернові субстрати масою 10,0 г у 100 мл колбах інокулювали двотижневі культури гриба на агарі Чапека і вирощували в термостаті при різних режимах.

Як природні поживні субстрати були досліджені стерильні зерна гречки, рису, пшениці, сої, проса, вівса, ячменю, жита, кукурудзи з білим та жовтим забарвленням зернівки та насіння соняшнику, на яких гриб вирощували протягом 14 днів при 25 °С та стільки ж часу – у холодильнику (4 °С).

При вивченні впливу температури на біосинтез Т-2 токсину гриб висівали на стерильні зерна жита, проса, ячменю, вівса, білої та жовтої кукурудзи масою 10 г у колбах ємкістю 100 мл та інкубували протягом 30 днів при 4, 12, 20, 24 і 37 °С.

Для вивчення впливу вологості субстрату на біосинтез Т-2 токсину гриб культивували на стерильних зернах проса, жита, ячменю, вівса, білої та жовтої кукурудзи різної вологості (14, 20, 30, 40 і 50 %) спочатку протягом 14 днів при 24 °С, а потім стільки ж часу витримували в холодильнику (4 °С).

Здатність виробляти зеараленон (F-2 токсин) та дезоксініваленол (ДОН) культури різних видів фузаріїв досліджували за допомогою ТШХ на пластинках “*Silufol*”. (Жбураєв В.И., 1990). Пластину оглядали в УФ–254. Зеараленон виявляли у вигляді плям блакитно-зеленого кольору з *Rf* – 0,50, а після обприскування 20-відсотковим розчином H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в метанолі та прогрівання протягом 10 хв при 110 °С проявлявся плямами цегляного кольору.

Властивість продукувати моніліформін досліджували у 25 культурах грибів роду *Fusarium* різних видів: *F. culmorum* (1 шт), *F. moniliforme var.lactis* (17 шт.), *F. solani* (7 шт.) методом ТШХ на пластинках “*Silufol*” (Rabie C.J. et al., 1978). Пластину оглядали в УФ–254. Моніліформін проявлявся плямами блакитно-зеленого кольору з *Rf* – 0,25–0,3. Після обприскування плям моніліформіну 2,4-денітрофенілгідразином та прогрівання при температурі 110 °С протягом 10 хв, він проявлявся плямами червоно-коричневого кольору.

Для вивчення афлатоксинуотворюючих властивостей штами гриба *Aspergillus flavus* культивували в колбах об’ємом 100 мл з 20 мл цукрово-дріжджового середовища (ЦДС), потім інкубували в термостаті при 37 °С та досліджували методом ТШХ (Львова А.С. и др., 1978). Наявність афлатоксинів встановлювали шляхом огляду хроматограм в УФ–356. Афлатоксинів при проведенні досліджень не виявлено. Одночасно визначали наявність коєвої кислоти якісною пробою шляхом обприс-



кування пластин 1-відсотковим розчином хлорного заліза. При наявності коевої кислоти з додаванням  $\text{FeCl}_3$  плями на пластинах забарвлювалися у червоний колір.

Для визначення токсичності 54 культури гриба *A. fumigatus* і 45 культур *A. niger* вирощували на агарі Чапека в чашках Петрі при температурі 37 °С протягом двох тижнів. Токсичні властивості грибів визначали мікробіологічним методом з використанням агарових блоків.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### Вивчення мікобіоти зерна кукурудзи

Мікологічним дослідженням 90 проб зерна кукурудзи методом серійних розведень встановлено, що кількість діаспор грибів в одному грамі зерна коливалась в межах від  $6,5 \cdot 10^3$  до  $7,01 \cdot 10^5$ , що в середньому склало  $1,37 \cdot 10^5 \pm 2,4 \cdot 10^4$  г. Щорічно на зерні кукурудзи знаходили майже однакову кількість діаспор (табл. 1).

Таблиця 1– Вміст діаспор грибів в 1 г зерна кукурудзи урожаїв різних років

Роки	Вміст діаспор	
	<i>Lim</i>	<i>M ± m</i>
2000	від $1,35 \cdot 10^4$ до $7,01 \cdot 10^5$	$1,45 \cdot 10^5 \pm 2,5 \cdot 10^4$
2001	від $1,25 \cdot 10^4$ до $4,92 \cdot 10^5$	$1,34 \cdot 10^5 \pm 2,7 \cdot 10^4$
2002	від $6,5 \cdot 10^3$ до $4,23 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^5 \pm 2,2 \cdot 10^4$

Із зазначених 90 проб зерна було виділено 527 культур грибів, які належать до трьох класів та 10 родів. Найчастіше на зерні кукурудзи знаходили гриби родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Absidia*, рідше представників *Alternaria*, *Trichoderma* та *Rhizopus* і в поодиноких випадках *Cladosporium* та *Acremonium*. Серед мукоральних грибів найчастіше зустрічалися види роду *Mucor* і менше – роду *Rhizopus* (рис. 1). Для визначення видового складу грибів роду *Fusarium* на зерні кукурудзи було ідентифіковано 64 ізоляти, виділених із 90 проб, які були віднесені до 5 секцій, 7 видів та 3-х різновидів (табл. 2).

Найбільша кількість ізолятів (22) належали до секції *Sporotrichiella* та були представлені двома різновидами одного виду. Секція *Elegans*

включала 17 ізолятів одного різновиду, 15 ізолятів секції *Discolor* віднесені до 4 видів, 9 ізолятів секції *Martiella* були представлені двома видами та один вид включає секція *Roseum*.

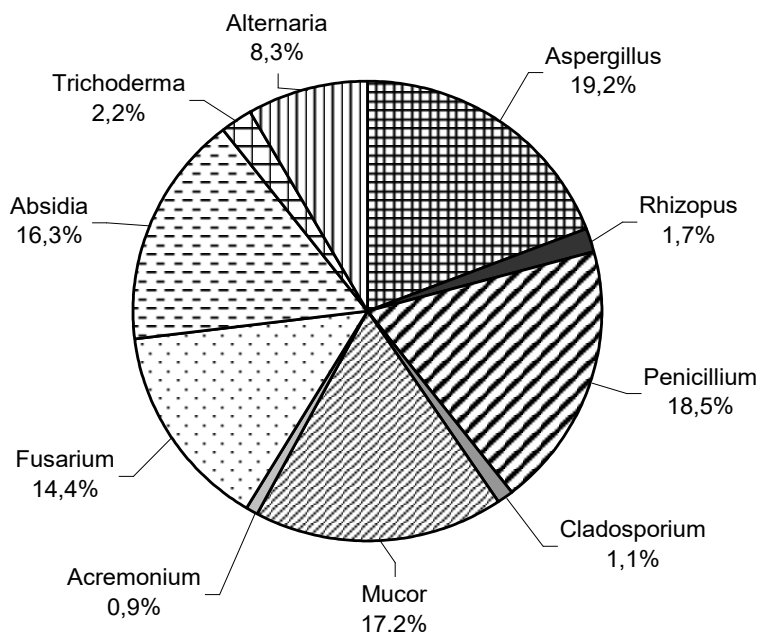


Рис. 1. Мікобіота зерна кукурудзи врожаю 2000–2002 років від загальної кількості вилучених грибів

Таблиця 2 – Видовий склад грибів роду *Fusarium* Lk на зерні кукурудзи (N=30 щорічно)

Секції, види та різновиди роду <i>Fusarium</i>	Роки урожаю							
	2000		2001		2002		2000–2002	
	Виділено							
	штамів	%	штамів	%	штамів	%	штамів	%
Секція <i>Discolor</i>								
<i>Fusarium graminearum</i>	6	20	2	6,6	–	–	8	8,8
<i>F. sambucinum</i>	2	6,6	1	3,3	–	–	3	3,3
<i>F. gibbosum</i>	2	6,6	–	–	1	3,3	3	3,3
<i>F. culmorum</i>	–	–	–	–	1	3,3	1	1,1
Секція <i>Martiella</i>								
<i>F. solani</i>	7	2,3	–	–	–	–	7	7,7
<i>F. javanicum</i>	2	6,6	–	–	–	–	2	2,2
Секція <i>Sporotrichiella</i>								
<i>F. sporotrichiella</i> v. <i>poae</i>	1	3,3	6	20	4	13,3	11	12,2
<i>F. sporotrichiella</i> v. <i>tricinctum</i>	2	6,6	1	3,3	8	26,6	11	12,2
Секція <i>Elegans</i>								
<i>F. moniliforme</i> var. <i>lactis</i>	4	13,3	5	16,6	8	26,6	17	18,8
Секція <i>Roseum</i>								
<i>F. semitectum</i>	–	–	1	3,3	–	–	1	1,1
Всього	26		16		22		64	

Отже, найчастіше на зерні кукурудзи знаходили гриби *F. moniliforme var. lactis*, *F. sporotrichiella var. poae* та *F. sporotrichiella var. tricinctum*, зрідка *F. graminearum* та *F. solani*, а решта видів зустрічалися в поодиноких випадках.

З грибів роду *Aspergillus* на зерні кукурудзи щорічно найчастіше зустрічалися види *A. flavus*, *A. fumigatus* та *A. niger*, менше – види *A. nidulans* та *A. terreus* і в поодиноких випадках *A. candidus* (табл. 3).

Таблиця 3 – Видовий склад грибів роду *Aspergillus Micheli* на зерні кукурудзи (N=30, щорічно)

Види грибів	Роки урожаю							
	2000		2001		2002		2000–2002	
	Виділено							
	штамів	%	штамів	%	штамів	%	штамів	%
<i>Aspergillus flavus</i>	20	66,6	22	73,3	17	56,6	59	65,5
<i>A. fumigatus</i>	21	70	17	56,6	16	53,3	54	60
<i>A. niger</i>	15	50	16	53,3	14	46,6	45	50
<i>A. nidulans</i>	3	10	2	6,7	–	–	5	5,5
<i>A. terreus</i>	4	1,3	–	–	–	–	4	4,4
<i>A. candidus</i>	2	0,6	–	–	–	–	2	0,02
Всього	65		57		47		169	

Таким чином, дослідження екзогенної мікобіоти зерна кукурудзи показали, що на ньому найчастіше знаходяться гриби родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Absidia*, *Fusarium* та *Alternaria*, зрідка представники родів *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Cladosporium* та *Acremonium*. Водночас глибинна мікобіота, яка свідчить про ураження зерна кукурудзи, була представлена мікроміцетами лише окремих видів грибів *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor* та *Trichoderma*.

Оскільки найбільшу небезпеку для здоров'я тварин становлять токсини грибів роду *Fusarium* і *Aspergillus*, то ізоляти цих родів стали об'єктом токсикологічних досліджень щодо з'ясування їх потенційної здатності продукувати певні мікотоксини.

### **Визначення токсигенних властивостей мікроміцетів Токсигенні властивості грибів роду *Fusarium***

При дослідженні 64 ізолятів грибів роду *Fusarium* 40 із них виявилися токсичними. Найбільша кількість токсичних штамів грибів виявлена серед виду *Fusarium sporotrichiella var. tricinctum* та *Fusarium moniliforme var. lactis*, менше токсичних було встановлено серед виду *Fusarium graminearum*, *Fusarium sporotrichiella var. poae* та *Fusarium solani*. Отже, використовуючи

мікробіологічний метод, нам вдалося виявити токсичні види фузаріїв та вивчити здатність грибів виробляти Т-2 токсин, зеараленон, ДОН та моніліформін (табл. 4).

Таблиця 4 – Продукція мікотоксинів грибами роду *Fusarium*

Секції, види та різновиди роду <i>Fusarium</i>	Штами фузаріїв				
	Досліджено штамів	Встановлено токсичних штамів*	Продукують мікотоксини		
			Т-2	Зеараленон	Моніліформін
Секція <i>Discolor</i>					
<i>Fusarium. graminearum</i>	8	5	2	2	нд
<i>F. sambucinum</i>	3	3	2	–	нд
<i>F. gibbosum</i>	3	–	–	1	нд
<i>F. culmorum</i>	1	1	–	–	нд
Секція <i>Martiella</i>					
<i>F. solani</i>	7	2	–	–	4
<i>F. javanicum</i>	2	–	–	нд	нд
Секція <i>Sporotrichiella</i>					
<i>F. sporotrichiella</i> var. <i>poae</i>	11	6	4	1	нд
<i>F. sporotrichiella</i> var. <i>trininctum</i>	11	9	5	1	нд
Секція <i>Elegans</i>					
<i>F. moniliforme</i> var. <i>lactis</i>	17	13	–	–	10
Секція <i>Roseum</i>					
<i>F. semitectum</i>	1	1	1	–	–
<b>ВСЬОГО</b>	<b>64</b>	<b>40</b>	<b>14</b>	<b>5</b>	<b>14</b>

**Примітка:** \* – за мікробіологічним тестом; нд – не досліджували.

Було встановлено, що Т-2 токсин виробляли 14 культур фузаріїв трьох видів та двох різновидів. F-2 токсин продукували 5 штамів грибів, що належали до двох секцій і представлені двома видами та двома різновидами. Моніліформін продукували 14 штамів грибів двох секцій та двох видів. Таким чином із досліджених 64 штамів грибів роду *Fusarium* у 33 із них вдалося виявити токсигенні властивості, причому два штами виду *F. graminearum* та два види *F. sporotrichiella* продукували одночасно Т-2 та F-2 токсини. Встановлено, що жоден з 14 досліджених штамів не продукував ДОН.

Отже, за сприятливих умов токсигенні гриби можуть розвиватися на кормах, при поїданні яких у тварин виникають захворювання на фузаріотоксикози.

Стосовно поширення продуцентів Т-2 токсину серед грибів роду *Fusarium* по роках і регіонах, встановлено, що гриби *F. sambucinum* та *F. sporotrichiella* var. *poae* були виділені із кукурудзи урожаю 2000 р. у

Київській області, а інші гриби урожаю 2001, 2002 рр. у Київській, Черкаській, Кіровоградській, Чернігівській та Житомирській областях.

### **Гриб *Fusarium sambucinum* Fuck – продуцент трихотеценового Т-2 токсину**

*Fusarium sambucinum* Fuck спричиняє розвиток фузаріотоксикозів, тобто він продукує токсичні речовини, природа яких остаточно не з'ясована. Тому метою наших досліджень було вивчення виду токсину, який продукує цей гриб.

При вивченні токсиноутворення токсиногенних грибів виду *Fusarium sambucinum* Fuck використовували штами 814/61 та 824/7, виділені із зерна кукурудзи урожаю 2000 р., зібраного в Київській області, токсичність яких була встановлена за мікробіологічним методом. Для накопичення токсину обидва штами культивували на зволоженому стерильному зерні рису і досліджували кількісним методом ТШХ з біоавтографією, в результаті чого було виявлено, що штам 824/7 продукував Т-2 токсин у кількості 31,6 мг/мл, а 814/61 – 0,33 мг/мл середовища. Наявність Т-2 токсину була підтверджена також ТШХ з проявленням токсину 20-відсотковим концентрованим розчином сірчаної кислоти. Хроматографічна рухливість (*R<sub>f</sub>*), як і у стандарту, в системі етилацетат– толуол (3:1) становила 0,35. Тому ми вирішили вивчити вплив факторів навколишнього середовища на біосинтез Т-2 токсину цим новим продуцентом.

### **Вплив факторів навколишнього середовища на біосинтез Т-2 токсину *Fusarium sambucinum* Fuck**

#### ***Біосинтез Т-2 токсину Fusarium sambucinum* Fuck штам 824/7 на різних зернових субстратах**

При вивченні біосинтезу Т-2 токсину на стерильних зернових субстратах встановлено, що *F. sambucinum* штам 824/7 продукував Т-2 токсин на всіх досліджених зернових субстратах (табл. 5).

Таблиця 5 – Біосинтез Т-2 токсину (мг/кг) *F. sambucinum* Fuck на різних зернових субстратах

Субстрат (зерно)	Штами <i>F. sambucinum</i> Fuck	
	824/7	814/61
	Вміст Т-2 токсину мг/кг	
1	2	3
Гречка	0,13	4,0
Рис	2,67	1,67
Пшениця	0,47	6,0
Кукурудза біла	0,77	16,13
Кукурудза жовта	11,45	2,4
Насіння соняшнику	6,75	1,08

1	2	3
Соя	1,5	0,47
Просо	24,65	0,17
Овес	36,3	24,2
Ячмінь	1,38	4,17
Жито	10,05	28,6

Найкращий біосинтез реєстрували на зерні вівса, проса, жовтій кукурудзі, насінні соняшнику та жита, а найменша кількість токсину утворювалася на зерні гречки, пшениці та білої кукурудзи. Другий штам 814/61 *F. sambucinum* також продукував Т-2 токсин на всіх зернових субстратах. Найбільшу його кількість виявляли в зерні жита, вівса, білої кукурудзи, меншу – в пшениці, ячмені та гречці, а найменше токсинування проходило при культивуванні гриба на зерні сої та проса.

### **Вплив температури культивування**

При вивченні впливу температури на біосинтез Т-2 токсину встановлено, що максимальну кількість Т-2 токсину *F. sambucinum* штам 824/7 продукував на зерні жита, ячменю та вівса при температурі 12 °С.

Значне токсинування спостерігалось при культивуванні гриба при 4 °С на зерні ячменю та жита, причому на ячмені більше ніж при 12 °С, а на інших субстратах – менше. В меншій кількості Т-2 токсин утворювався при 20 °С, а при 24 та 37 °С продукування Т-2 токсину грибом значно знижувалася (табл. 6).

Таблиця 6 – Біосинтез Т-2 токсину (мг/кг) *F.sambucinum Fuck* при різних температурах

Субстрат (зерно)	Температура культивування (°С)				
	4	12	20	24	37
Жито	17,6	24,0	12,0	0,51	1,13
Просо	0,62	2,64	1,4	0,65	0,96
Ячмінь	20,0	16,67	8,14	0,93	1,56
Овес	3,96	8,25	0,93	0,53	1,12
Кукурудза біла	0,9	2,5	2,0	1,5	1,26
Кукурудза жовта	1,44	2,41	0,67	0,7	1,2

Таким чином, температура 12 °С виявилася оптимальною для біосинтезу Т-2 токсину *Fusarium sambucinum*, а зниження її та підвищення призводить до зменшення токсинування. Водночас оптимальна температура росту *Fusarium sambucinum* (24 °С) не співпадала з оптимальною температурою біосинтезу Т-2 токсину (12 °С).

### Вплив вологості зернових субстратів

Для вивчення впливу вологості *Fusarium sambucinum* штам 824/7 вирощували на шести зернових субстратах різної вологості (табл. 7). Дослідженнями встановлено, що оптимальна вологість зерна для біосинтезу Т-2 токсину становила 50 % і максимальна кількість токсину спостерігалася в зерні проса, кукурудзи та жита. За 40-відсоткової вологості токсинуутворення знижувалося на всіх видах зерна, окрім жита, а при 30-відсотковій – погіршувалося ще більшою мірою, за винятком зерна білої кукурудзи та жита, і значно зменшувалося при 20-і 14-відсотковій вологості. Отже, вологість субстрату в 50 % була оптимальною для біосинтезу Т-2 токсину цим грибом.

Таблиця 7 – Біосинтез Т-2 токсину (мг/кг) *F. sambucinum* при різній вологості зернових субстратів

Субстрат (зерно)	Вологість (%)				
	14	20	30	40	50
Пшениця	0,25	1,0	3,4	8,5	14,6
Овес	0,3	1,7	3,8	9,5	15,0
Жито	0,3	3,0	6,0	20,83	16,5
Ячмінь	0,3	1,9	4,4	7,5	15,0
Просо	0,3	1,5	6,0	12,5	41,25
Кукурудза біла	0,3	1,7	15,0	16,5	25,0

### Вплив різних режимів культивування

З літературних публікацій відомо, що види грибів секції *Sporotrichiella* більш інтенсивно продукують Т-2 токсин, коли їх культивують спочатку при оптимальній температурі росту гриба (25 °С), а потім при понижений (4 °С). Водночас встановлено (Рухляда В.В., 1989), що більш активне токсинуутворення відбувається при культивуванні грибів лише за низької температури (4 °С). Тому було вирішено перевірити як ці режими культивування впливатимуть на біосинтез Т-2 токсину *F. sambucinum*. Для цього було поставлено два досліди: в першому посіви грибів вирощували на стерильних зернах гречки, рису, пшениці, проса, вівса, ячменю, жита, кукурудзи з білим та жовтим забарвленням зернівки та насінні соняшнику два тижні при 25 °С, а потім – два тижні в холодильнику при 4 °С, у другому – посіви культивували на тих же зернах протягом місяця в холодильнику при 4 °С.

Встановлено, що при культивуванні протягом місяця при температурі 4 °С на всіх субстратах спостерігали слабозвинений повітряний міцелій, але вміст

Т-2 токсину на всіх зернових субстратах, окрім зерна жовтої кукурудзи та ячменю, був значно більшим і перевищував уміст токсину, порівняно з першим

дослідом, на 121 – 498,7 %. Але на зерні жовтої кукурудзи та ячменю навпаки – вміст токсину зменшився і становив відповідно 43,6 % та 81,4 %, порівняно з першим дослідом.

Отже, виконані дослідження показали, що *F. sambucinum* продукує Т-2 токсин на всіх досліджених зернових субстратах з різною інтенсивністю, виявлено субстрати на яких спостерігається краще токсиноутворення, що значною мірою залежить від ступеня вологості субстрату і температурного режиму вирощування. Ці результати певною мірою корелюються з даними інших дослідників, які вивчали питання біосинтезу Т-2 токсину грибами секції *Sporotrichiella* (Костюнина Н.А., 1979; Рухляда В.В., 1989; Joffe A.Z., 1974).

Водночас слід зазначити, що кількість Т-2 токсину, що продукував *F. sambucinum* на всіх зернових субстратах була значно меншою, порівняно із продукуванням видами *F. sporotrichiella* та його різновидами (Билай В.И. и др., 1983; Костюнина Н.А., 1979; Рухляда В.В., 1989). Це може бути причиною накопичення незначної кількості Т-2 токсину в кормах, уражених цим видом гриба. При поїданні тваринами таких кормів може спостерігатися безсимптомний перебіг фузаріотоксикозу, який супроводжується дозозалежним пригніченням приросту живої маси та порушенням імуногенезу, що дуже важко діагностується у виробничих умовах.

### **Розробка способу експресного визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати Т-2 токсин**

Лабораторна діагностика фузаріотоксикозів, окрім встановлення вмісту токсину в кормах, передбачає проведення мікологічного дослідження для виділення грибів та визначення їх токсичності. Тому з метою прискорення діагностики фузаріотоксикозів ми провели дослідження і розробили методику експресного визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати Т-2 токсин.

У роботі попередньо були використані 7 культур грибів роду *Fusarium*, з яких 4 – *F. sporotrichiella* var. *tricinctum* та 3 – *F. sporotrichiella* var. *poae*. Шість токсичних штамів утворювали зони затримки росту тест-культури *Candida pseudotropicalis* шт. 44 ПК діаметром від 15 до 18 мм, а один – слаботоксичний – давав зону затримки росту тест-культури 9 мм. Продукція Т-2 токсину зазначеними штамми була встановлена для екстрактів із цих фузаріїв, вирощених на стерильному зерні кукурудзи. Водночас досліджували токсинпродукуючі властивості у вищезгаданих культур, вирощених у пробірках на скошеному агарі Чапека і сусло-агарі із різними режимами культивування. Для цього гриби культивували в пробірках на скошеному агарі Чапека та на сусло-агарі при 24 °С і витримували ще при 4 °С (в холодильнику) з метою накопичення Т-2 токсину в різні терміни:



виросували відповідно за 10 і 15, 9 і 10, 8 і 5, 7 і 2, 6 і 1, 5 і 0 діб. Екстракцію токсину проводили безпосередньо із культури гриба в пробірці на агаризованому середовищі 10 мкл етилацетату протягом 1 год, після чого екстракт зливали у випаровувальну чашку для видалення розчинника у потоці повітря, а потім залишок перерозчиняли у 100 мкл етилацетату і використовували для дослідження. Було встановлено мінімальний термін культивування, при якому ще спостерігалось токсиноутворення: інкубація протягом 7 днів при 24 °С і 2 дні у холодильнику при температурі 4 °С, а вміст Т-2 токсину при цьому становив від 0,31 до 0,52 мг/мл середовища, а у слаботоксичного – 0,15 мг/мл середовища.

Отримані результати щодо Т-2 токсинопродукуючих властивостей були підтверджені вищевказаним методом з іншими 16 штамами токсичних грибів роду *Fusarium*, серед яких, окрім зазначених вище двох видів, були також

*F. semitectum*, *F. sambucinum* і *F. graminearum*.

Отже, нам вдалося відпрацювати режим культивування грибів, який забезпечує накопичення Т-2 токсину в культурах на агарі Чапека в кількості, достатній для детекції методом ТШХ з біоавтографією. Запропонований спосіб визначення Т-2 токсину в культурах фузаріїв дозволяє значно скоротити термін проведення дослідження, оскільки відпадає потреба у тривалому (близько місяця) культивуванні фузаріїв на стерильних зернових субстратах і його можна використовувати в лабораторіях ветеринарної медицини країни. Новизна його була підтверджена отриманим деклараційним патентом на винахід: "Спосіб експресного визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати Т-2 токсин": Пат.4794, С12N1/100; Заявл. 20.04.2004; Опубл. 15.02.2005, Бюл. №2.

### **Вивчення токсигенних властивостей грибів роду *Aspergillus***

Токсикологічному дослідженню піддано 152 штами грибів роду *Aspergillus*, в тому числі *A. flavus* – 53, *A. fumigatus* – 54 та *A. niger* – 45.

В результаті проведених досліджень було встановлено, що жоден із 53 досліджуваних штамів *A. flavus* не продукував афлатоксинів, а 22 (41,5 %) продукували коєву кислоту, яка після обприскування хроматографічних пластин розчином хлорного заліза в етанолі проявлялася плямами коричнево-вишневого кольору.

Токсичність 45 штамів *Aspergillus niger* та 54 штамів *Aspergillus fumigatus* визначали мікробіологічним методом з використанням агарових

блоків. Жоден із досліджених штамів *A. fumigatus* та *A. niger* не виявився токсичним.

Таким чином, токсикологічним дослідженням не встановлені токсичні властивості серед ізолятів аспергіл видів *A. fumigatus* та *A. niger*, а серед ізолятів *A. flavus* не виявлено продуцентів афлатоксину, стеригматоцистину та охратоксину і лише 41,5 % продукували коєву кислоту.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлений кількісний і якісний склад мікобіоти зерна кукурудзи та виявлені гриби-продуценти Т-2 токсину, зеараленону, моніліформіну та коєвої кислоти. Уперше виділений *F. sambucinum* – продуцент Т-2 токсину, вивчений вплив на його біосинтез виду субстрату, температури, вологості та терміну культивування і розроблений експрес-метод визначення здатності фузаріїв продукувати цей токсин, що значно скорочує термін проведення таких досліджень при діагностиці фузаріо-Т-2 токсикозу тварин.

2. Мікологічним дослідженням встановлено, що в 1 г зерна кукурудзи урожаїв 2000–2002 рр. вміст діаспор грибів коливався від  $6,5 \cdot 10^3$  до  $7,01 \cdot 10^5$ , що в середньому становить  $1,37 \cdot 10^5 \pm 2,4 \cdot 10^4$  г.

3. Із 90 проб зерна кукурудзи виділено та ідентифіковано 527 культур грибів трьох класів і 10-ти родів. Найчастіше зустрічалися види мікроміцетів родів *Aspergillus Mich* (94,4 %), *Penicillium Link* (91,1 %), *Mucor Micheli* (84,4 %), *Absidia v. Tiegh* (80,0 %) та *Fusarium Link* (71,1 %), трохи рідше – *Alternaria Nees* (41,1 %), *Trichoderma Pers. ex Fr* (11,1 %) та *Rhizopus Ehrenb* (8,8 %) і зрідка – *Cladosporium Link* (5,5 %) та *Acremonium Link ex Fr* (4,4 %).

4. Серед мікобіоти зерна встановлені продуценти: Т-2 токсину *F. sporotrichiella var. tricinctum*, *F. graminearum* та *F. sambucinum*; зеараленону – *F. graminearum*, моніліформіну – *F. solani* та *F. moniliforme var. lactis*.

5. Токсикологічним дослідженням грибів роду *Aspergillus* не встановлено токсичних властивостей в ізолятів *A. fumigatus* та *A. niger*, не виявлено продуцентів афлатоксинів у *A. flavus*, в той час, як 41,5 % останнього продукували коєву кислоту.

6. Уперше в Україні в зерні кукурудзи виявлений новий продуцент трихотеценового фузаріотоксину Т-2 – *Fusarium sambucinum Fuck*, два штами якого виробляли токсин в кількості 0,33 мг/мл та 31,06 мг/мл середовища.

7. Гриб *F. sambucinum* продукував Т-2 токсин на 11 досліджених зернових субстратах, але найкращими для біосинтезу виявилось зерно вівса, жита, проса, насіння соняшнику та жовтої кукурудзи, трохи гірше токсинуотворення спостерігалось на зернах рису, ячменю та білої кукурудзи і зовсім погано на зерні пшениці та гречки.

8. Встановлено, що на біосинтез Т-2 токсину суттєво впливає температура, вологість субстрату та термін культивування. Оптимальними для біосинтезу Т-2 токсину *F. sambucinum* на більшості видах зерна була температура 12° С, вологість субстрату – 50 % і культивування протягом місяця при низькій температурі.

9. Відпрацьований режим культивування фузаріїв щодо накопичення Т-2 токсину безпосередньо в культурах грибів роду *Fusarium* на агарі Чапека, що дозволяє встановлювати гриби-продуценти токсину шляхом ТШХ з біоавтографією протягом 10 днів. Новизна методу підтверджена патентом.

### ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Методика експресного визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати Т-2 токсин пропонується для застосування у лабораторіях ветеринарної медицини країни та в науково-дослідних лабораторіях профільних наукових установ.

2. Фахівцям ветеринарної медицини при діагностиці мікотоксикозів необхідно враховувати, що зерно кукурудзи частіше забруднене грибами роду *Fusarium* – продуценти Т-2 токсину, F-2 токсину та моніліформіну.

3. Науковцям при проведенні наукових досліджень з грибом *Fusarium sambucinum* потрібно враховувати оптимальні режими його токсинування – на зерні проса, жита, ячменю та білій кукурудзі при температурі 12 °С і вологості 50 % протягом двох тижнів та стільки ж часу при 4 °С.

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Рухляда В.В., Білик С.А. Гриб *Fusarium sambucinum* Fuck – продуцент трихотеценового фузаріотоксину Т-2 // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – Біла Церква, 2002. – Вип. 21. – С. 191–196. (Дисертантом організовано дослід, проведено експериментальні дослідження й узагальнено результати).

2. Білик С.А. Біосинтез Т-2 токсину грибом *Fusarium sambucinum* Fuck на різних зернових субстратах // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – Біла Церква, 2002. – Вип. 23. – С. 3–7.

3. Білик С.А. Вплив температури та вологості на біосинтез Т-2 токсину грибом *Fusarium sambucinum* Fuck // Ветеринарна біотехнологія, бюл. УААН ІВМ № 3, 2003. – К.: Аграрна наука, 2004. – С. 3–7.

4. Мікроміцети зерна кукурудзи і токсигенні властивості грибів родів *Aspergillus Mich* та *Fusarium Lk* / В.В. Рухляда, С.А. Білик, М.М. Кулініч та ін. // Ветеринарна біотехнологія, бюл. УААН ІВМ № 4, 2004. – К.: Аграрна

наука, 2004. – С. 171–176. (Дисертантом проведено аналіз та узагальнення результатів дослідження).

5. Рухляда В.В., Білик С.А. Біосинтез Т-2 токсину грибом *Fusarium sambucinum* Fuck на зернових субстратах за різної вологості та температури вирощування // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – Біла Церква, 2005. – Вип. 34. – С. 152–157. (Дисертантом проведено експериментальні дослідження, узагальнено результати та підготовлено матеріали статті до друку).

6. Деклараційний патент України на корисну модель 4794, С12N1/100. Спосіб експресного визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати Т-2 токсин / В.В. Рухляда, С.А. Білик, С.І. Тарануха. – № 4794, С12N1/100; Заявл. 20.04.2004; Видано 15.02.2005. (Дисертант розробив спосіб експресного визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати Т-2 токсин, провів експериментальні дослідження, брав участь в обробці результатів та оформленні деклараційного патенту України на винахід).

## АНОТАЦІЯ

**Білик С.А. Мікобіота зерна кукурудзи та токсигенні властивості грибів родів *Fusarium Link* та *Aspergillus Micheli*– Рукопис.** Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія. – Одеський державний аграрний університет. – Одеса, 2006.

Дисертація присвячена вивченню питань розповсюдження грибів на зерні кукурудзи різних регіонів України, встановленню токсичних властивостей грибів родів *Fusarium* і *Aspergillus* та видів токсинів, що вони продукують, а також вивченню впливу факторів навколишнього середовища на біосинтез Т-2 токсину та розробці експрес-методу визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати Т-2 токсин. Встановлений кількісний та якісний склад мікобіоти зерна кукурудзи в різних регіонах України, здатність грибів роду *Fusarium* продукувати фузаріотоксини (Т-2 токсин, F-2 токсин (зеараленон) і моніліформін) та гриба *A. flavus* продукувати коєву кислоту. Вперше досліджена здатність грибом *F. sambucinum* продукувати Т-2 токсин та вивчений вплив на біосинтез токсину факторів навколишнього середовища (вид субстрату, температура, вологість, термін культивування). Розроблений експрес-метод визначення здатності продукувати Т-2 токсин грибами роду *Fusarium*, на який отримано деклараційний патент 4794, С12N1/100 (Спосіб експресного визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати Т-2 токсин).

**Ключові слова:** біосинтез, експрес-метод, ідентифікація, мікобіота, продуцент, субстрат, токсин, токсичність, тонкошарова хроматографія, штам.

## АННОТАЦИЯ

**Билык С.А. Микобиота зерна кукурузы и токсигенные свойства грибов родов *Fusarium Link* и *Aspergillus Micheli*. Рукопись. Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология и вирусология. – Одесский государственный аграрный университет. – Одесса, 2006.**

Диссертация посвящена изучению вопросов распространения грибов на зерне кукурузы различных регионов Украины, установлению токсических свойств грибов родов *Fusarium* и *Aspergillus*, видов токсинов, что они продуцируют, а также изучению влияния факторов внешней среды на биосинтез Т-2 токсина и разработке экспресс-метода определения способности грибов рода *Fusarium* продуцировать Т-2 токсин. Микологическим исследованием 90 проб зерна кукурузы урожаев 2000–2002 года установлено, что количество диаспор грибов в одном грамме зерна ежегодно было почти одинаковым и колебалось в пределах от  $6,5 \cdot 10^3$  до  $7,01 \cdot 10^5$ , что в среднем составляло  $1,37 \cdot 10^5 \pm 2,4 \cdot 10^4$ . Из исследованных проб зерна было выделено 527 культур грибов, относящихся к трем классам и 10 родам. Наиболее часто на кукурузе обнаруживали грибы родов *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* и *Absidia*, реже представителей родов *Alternaria*, *Trichoderma* и *Rhizopus* и в единичных случаях *Cladosporium* и *Acremonium*. Видовой идентификации было подвергнуто 64 изолята грибов рода *Fusarium*, которые были отнесены к 5 секциям, 7 видам и трем разновидностям. Из них 22 изолята включала секция *Sporotrichiella* и была представлена двумя разновидностями одного вида, секция *Elegans* включала 17 изолятов одного разновидности, 15 изолятов секции *Discolor* отнесены к 4 видам, 9 изолятов секции *Martiella* представлены двумя видами и один вид включает секция *Roseum*. Из грибов рода *Aspergillus* на зерне кукурузы ежегодно наиболее часто встречались виды *A. flavus*, *A. fumigatus* и *A. niger*, реже виды *A. nidulans* и *A. terreus* и в единичных случаях вид *A. candidus*. 40 культур грибов рода *Fusarium* из 64 исследованных обладали токсигенными свойствами, из которых по 14 продуцировали Т-2 токсин и монилиформин и 5 зеараленон. Впервые установлена способность грибом *F. sambucinum* продуцировать Т-2 токсин и изучено влияние на биосинтез токсина факторов внешней среды (вид субстрата, температура, влажность, срок культивирования). Разработан экспресс-метод определения способности продуцировать Т-2 токсин грибами рода *Fusarium*, на который получен декларационный патент 4794, С12N1/100 (Способ экспрессного определения способности грибов рода *Fusarium* продуцировать Т-2 токсин). Ни один из 53 штамов *A. flavus* не вырабатывали афлатоксины и только 22 (41,5 %)

образовывали койевую кислоту и не установлена токсичность микобиологическим методом 45 штаммов *A. niger* и 54 штаммов *A. fumigatus*.

**Ключевые слова:** биосинтез, экспресс-метод, идентификация, микобиота, продуцент, субстрат, токсин, токсичность, тонкослойная хроматография, штамм.

## ANNOTATION

**Bilik S.A. Microbiots of maiz grain and toxigenic properties of fungus of *Fusarium Link* and *Aspergillus Micheli* breeds.** 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, 2006.

The dissertation is devoted to the study of fungus distribution on maiz grain in different regions of Ukraine, establishing of the toxic properties of fungus of *Fusarium* and *Aspergillus* breed and sorts of toxins they produce, the study of influence of enviromental factors on biosynthesis of T-2 toxin and development of express-method of determination of ability of fungus of *Fusarium* species to produce T-2 toxin. There were established the qualitative and quantitative content of microbiot of maiz grain in different regions of Ukraine, ability of fungus of *Fusarium* species to produce fusariotoxins (T-2 toxin, F-2 toxin (zearalenon) and moniliformin) and fungus *A. flavus* to produce koev acid. For the first time there was investigated the ability of the fungus *F. sambucinum* to produce T-2 toxin and there was studied the influence of environment (the kind of substrat, temperature, humidity, time of cultivation) on toxin biosynthesis. There was developed the express-method of determination of the ability to produce T-2 toxin by *Fusarium* species there was obtained the declarative patent 4794, C12N1/100 (The method of express determination of ability of fungus of *Fusarium* species to produce T-2 toxin).

**Key words:** byosynthesis, express-method, identification, microbiots, producent, substrat, toxin, toxicity, fine-stratum chromatography, culture.

Підписано до друку 22.05.2006.  
Формат 60x90 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Ум. др. арк. 0,9. Тираж 100. Зам. 3124.  
Сектор оперативної поліграфії РВІКВ БДАУ.  
09117, Біла Церква, Соборна площа, 8/1; тел. 3-11-01.