

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ПОЛІСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет ветеринарної медицини
Кафедра мікробіології, фармакології та епізоотології

Кваліфікаційна робота
на правах рукопису

Костенок Сергій Володимирович

УДК: 579.2::633.1

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**Представники мікобіоти концентрованих кормів
як імовірні збудники мікотоксикозів**

**Mycobiota Representatives of the Concentrates
as Probable Agents of Mycotoxicosis**

211 «Ветеринарна медицина»

Подається на здобуття освітнього ступеня «Магістр»

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень.
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на
відповідне джерело.

Костенок С.В..

Керівник роботи
Солодка Л.О.
к. біол.н., доцент

Житомир – 2022

АНОТАЦІЯ

Костенок С.В. Представники мікобіоти концентрованих кормів як імовірні збудники мікотоксикозів – Кваліфікаційна робота на правах рукопису.

Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня магістра за спеціальністю 211 – ветеринарна медицина. – Поліський національний університет, Житомир, 2022.

Зміст анотації. Оцінено обсіменіння зародками потенційних продуцентів мікотоксинів поверхні зерен пшениці, вирощеної в Житомирському Поліссі в 2020 р. Склад мікробних асоціацій вивчали при культивуванні на агарах Чапека та Сабуро. Температурний режим імітував умови, за яких на зернинах, влітку 2020 р., було утворено мікробну асоціацію (32°C, 23°C та 15°C) та умови збереження зерен на складах (4-6°C). До складу асоціацій, в різних пропорціях, входили клітини різних видів бацил, дріжджові та міцеліальні гриби (в тому числі, можливі продуценти мікотоксинів з родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*).

Ключові слова: мікробні асоціації, ураженість зерна пшениці, міцеліальні гриби, дріжджі, бацили, культуральні властивості колоній, токсинопродуценти.

SUMMARY

Kostenok S.V. – Mycobiota Representatives of the Concentrates as Probable Agents of Mycotoxicosis – Manuscript qualification work.

Qualification work for the master's degree in specialty 211 – veterinary medicine. – Poleski National University, Zhytomyr, 2022.

Contents of the abstract. We have assessed the surface contamination of wheat grains grown in Zhytomyr Polissya in 2020 by potential mycotoxins producers. The composition of microbial associations was studied in incubation at temperatures of 32°C, 23°C, 15°C and 4-6°C. Representatives of the fungi morphological group (mycelial, yeast) and single colonies of different Bacillus types were developed in any cultivation conditions.

Key words: microbial associations, surface contamination of wheat grains, mycelial fungi, yeast, bacillus, cultural features of colonies, toxin producers.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1 Загальна характеристика властивостей різних видів мікроміцетів.....	7
1.2 Морфо-фізіологічна характеристика продуцентів мікотоксинів – багатоклітинних міцеліальних грибів.....	9
Висновки до розділу 1.....	14
РОЗДІЛ 2 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	15
2.1 Матеріали і методи досліджень	15
2.2 Результати власних досліджень.....	19
2.2.1 Особливості розвитку мікробної асоціації на агарі Чапека.....	19
2.2.2 Особливості розвитку мікробної асоціації на агарі Сабуро...	25
Висновки до розділу 2.....	28
РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	29
Висновки до розділу 3.....	30
ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ	31
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	32

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ,
СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

АЧ – агар Чапека

АС – агар Сабуро

КУО/г – колонієутворюючі одиниці, кількість зародків мікроорганізмів (вегетативних клітин, ендоспор, конідій, спорангіоспор тощо) в чашці Петрі.

pH – кислотність розчину (в роботі – кислотність поживних середовищ для культивування мікроорганізмів).

ФВМ – факультет ветеринарної медицини

ВСТУП

Актуальність теми дослідження. В приватних тваринницьких господарствах різної потужності, зосереджуються значні запаси кормів. Під час їх зберігання з речовинами корму можуть взаємодіяти мікроорганізми, комахи та гризуни. Користування арочними чи полігональними ангарами, складами закритої конструкції («напольне зберігання») дозволяє захистити корми від гризунів, зменшити вплив коливань вологи тощо. Але і тоді, уникнути присутності мікробів, що утворюють на зерні асоціації невідомого складу, неможливо.

Серед представників даної змішаної культури окремої уваги заслуговують міцеліальні гриби, генетично здатні до синтезу мікотоксинів, через що у тварин часто виникають хронічні отруєння – мікотоксикози. Потрапляння на зерна грибів різних родів є досить стабільним процесом, вплинути на який в природних умовах неможливо.

На території України, з поверхні зернових кормів, найчастіше виділяють міцеліальні гриби родів *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Cladosporium*. Під час зберігання корму (в залежності від температурного режиму та апаратурної комплектації складу) виникає можливість для проростання їх спор, розвитку мікрочасточок міцелію або міцеліальних плівок значної площі, накопичення певних видів мікотоксинів в певних кількостях.

Взаємодія останніх з організмом тварин спричинює імунодепресію (підвищення частоти виникнення інфекцій, збільшення витрат на лікування), а недоотримання продукції призводить до зниження рентабельності виробництва.

Тому проведення досліджень для виявлення мікроміцетів – потенційних продуцентів мікотоксинів є економічно значущим для зерновиробництва у всьому світі та актуальним, оскільки 70% спожитих тваринами речовин переходять до раціону людини.

Мета і завдання роботи. Виявлення складу мікробних асоціацій, розташованих на поверхні зерен озимої пшениці, родова ідентифікація міцеліальних грибів, генетично здатних до синтезу мікотоксинів.

Предмет та об'єкт дослідження. Предмет дослідження – зерно фуражної пшениці, зібране влітку 2020 року і використане як складова раціону свиней через рік, в господарстві замкненого циклу в Житомирському Поліссі. Об'єкт дослідження – міцеліальні гриби певних родів, які є можливими продуцентами мікотоксинів.

Методи дослідження. В роботі використовували мікологічні, бактеріологічні та статистичні дослідження. Методом поверхневого висіву проводили вирощування накопичувальних культур, що формують мікробну асоціацію поверхні зерен (представники багатьох видів з двох морфологічних груп) та чистих культур міцеліальних грибів. Надалі у висівах докладно вивчали культуральні ознаки (підтвердження належності ізолятів до певної морфологічної групи та роду), статистично обробляли результати кількісних висівів.

Перелік публікацій автора. 1. Солодка Л.О., Кривда М.І., Костенок С.В., Смуров Г.О. Мікробне обсіменіння зерен пшениці, вирощеної в Житомирському Поліссі. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина*, 2022. №4 (прийнято до друку).

Практичне значення отриманих результатів. Родова ідентифікація мікроміцетів та відомості щодо їх розвитку на зернах за різних температурних умов дозволять спеціалістам тваринницького господарства, при зборі зразків для подальшого токсикологічного аналізу, направлено виявляти можливі види мікотоксинів.

Структура та обсяг роботи. Дипломна робота включає всі розділи, зазначені в «Методичних порадах до написання кваліфікаційної роботи для студентів спеціальності 211 «Ветеринарна медицина». Написана на 36 сторінках, містить 5 таблиць, 18 рисунків, 42 посилання на бібліографічні джерела та електронні ресурси.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальна характеристика властивостей різних видів мікроміцетів

До царства Fungi (гриби) входить 250 тисяч видів, з яких повністю досліджені та ідентифіковані згідно правил номенклатури близько 100 тисяч. Дані мікроорганізми відіграють визначну роль в багатьох обмінних процесах, що відбуваються в біосфері [1-4]. В останні десятиріччя стало зрозуміло, що гриби, як і бактерії, в значних кількостях асимілюють мінеральні з'єднання нітрогену, органічні азотовмісні полімери (гумінові сполуки, танін-білкові комплекси), утилізують атмосферний аміак, за наявності надмірних кількостей азоту різко збільшують синтез певних типів власних мономерних та полімерних речовин, таких як глютамін та глютамінова кислота, хітин та певні білки.

Вони виявляються в будь-яких екологічних нішах, навіть в місцях з екстремальними умовами (грунти Арктики та пустель, засолені системи із лужним рН, зони нафтовидобування, шахтні відвали, системи з високим вмістом поліметалевого пилю, сполук флуору та сірчаного ангідриду). Гриби взаємодіють з живими організмами різних царств, класів і видів (мікориза рослин, грибний компонент лишайників, ентомофільні гриби хітинових покривів чи кишечника комах, сапрофітні гриби, що переносяться на шерсті норних дрібних ссавців тощо).

Її внутрішньовидове різноманіття, наявність у кожного виду чи біоваріанту розвинених і потужних ферментних комплексів під час взаємодії їх природними об'єктами і продуктами діяльності людини спричинює широке коло біопшкоджень [5,6]. Зараз відомо близько 500 видів грибів, які є так званими збудниками деструкції (конструкції з деревини, бетон та будівельні суміші, певні типи полімерних речовин, магнітні носії, паперова і лакофарбова продукція та ін.). Вважають, що активну біодеструкцію можуть спричинювати представники таких поширених родів та видів міцеліальних грибів як *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. luteus*),

Penicillium (*P. glaucum*, *P. chrisogenum*, *P. purpurogenum*, *P. funiculosum*, *P. citronum*, *P. rugulosum*, *P. ochrochloron*), Trichoderma (*T. viride*, *T. sp.*), Cladosporium (*C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum*), Alternaria, Mucor та Scopulariopsis.

Так само, природнім чином, контамінуються міцеліальними грибами і зернові корми. Це відбувається в польових умовах (виросування рослин, збір врожаю) залежно від температури та вологості повітря, кількості та інтенсивності опадів в певному регіоні, і додатково – під час транспортування зернових до місця збереження та на самих складах [7-10]. У помірних широтах на зерні можуть зустрічатись представники таких видів як *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. ochraceus* тощо. Контамінантами можуть бути також і представники родів *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Ulocladium*, *Stemphylium*, *Scytalidium*, *Acremonium* [11,12].

Доведено, що і в засушливих зонах на території Європи зараженість зерна 3 класу альтернарією складає 37%, ризопусом – 24%, аспергилами – до 13%, пеніцилами – 12%, бактеріями – 11%, а фузаріями – на рівні 1-2 %. На території України із зазначених вище 11 родів мікроміцетів в складі епідермальної (поверхневої) мікобіоти найчастіше виявляють представників 5-ти родів (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Rhizopus*), а також – роду *Mucor* [13, 14]. Одноклітинні гриби родів *Mucor* та *Rhizopus* мікотоксикозів не спричинюють. Але представники інших вищезазначених родів багатоклітинних грибів виділяють різноманітні токсини, тому опис їх морфології, культуральних ознак та можливостей до синтезу мікотоксинів тих чи інших видів представляється доцільним [15-21].

1.2 Морфо-фізіологічна характеристика продуцентів мікотоксинів – багатоклітинних міцеліальних грибів

Чисельні види та підвиди грибів з р.*Aspergillus* утворюють гілкуватий міцелій з численними перетинками – септами Їх репродуктивні структури

(конідієносці) – прямі, без перетинок (рис.1). Верхівка має вигляд невеликої голівки з радіально розташованими фіалідами (в 1 або 2 яруси).

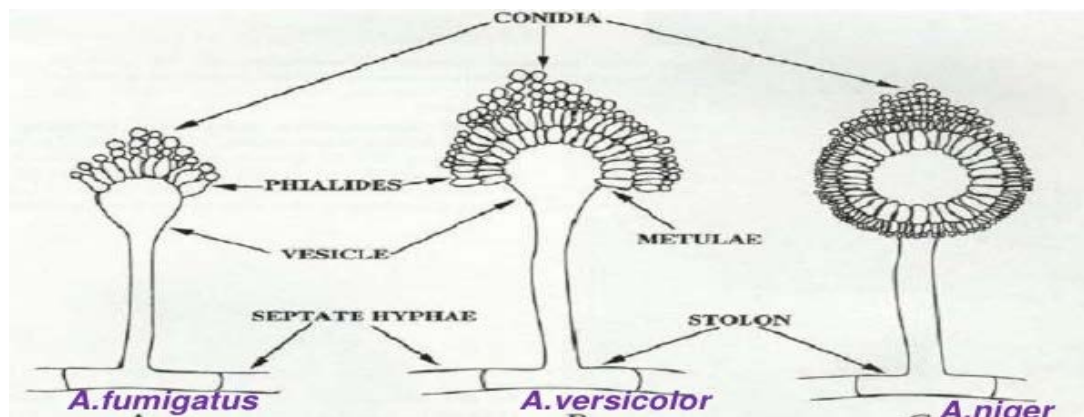


Рис.1 Морфологічні ознаки у аспергилів різних видів (септовані гіфи, специфіка розміщення конідій на конідієносцях).

На кінцях фіалід в один, декілька рядів чи ланцюжками розміщені кулясті, еліптичні конідії сірувато-зеленого, жовто-зеленого або коричнево-чорного кольору. Саме тому колонії аспергилів (рис.2) мають колір їх конідій, і поверхня зрілих колоній є сіруватою чи зеленуватою (*A. fumigatus*), чорною або коричневою (*A. niger*), жовто-зеленою (*A. flavus*).

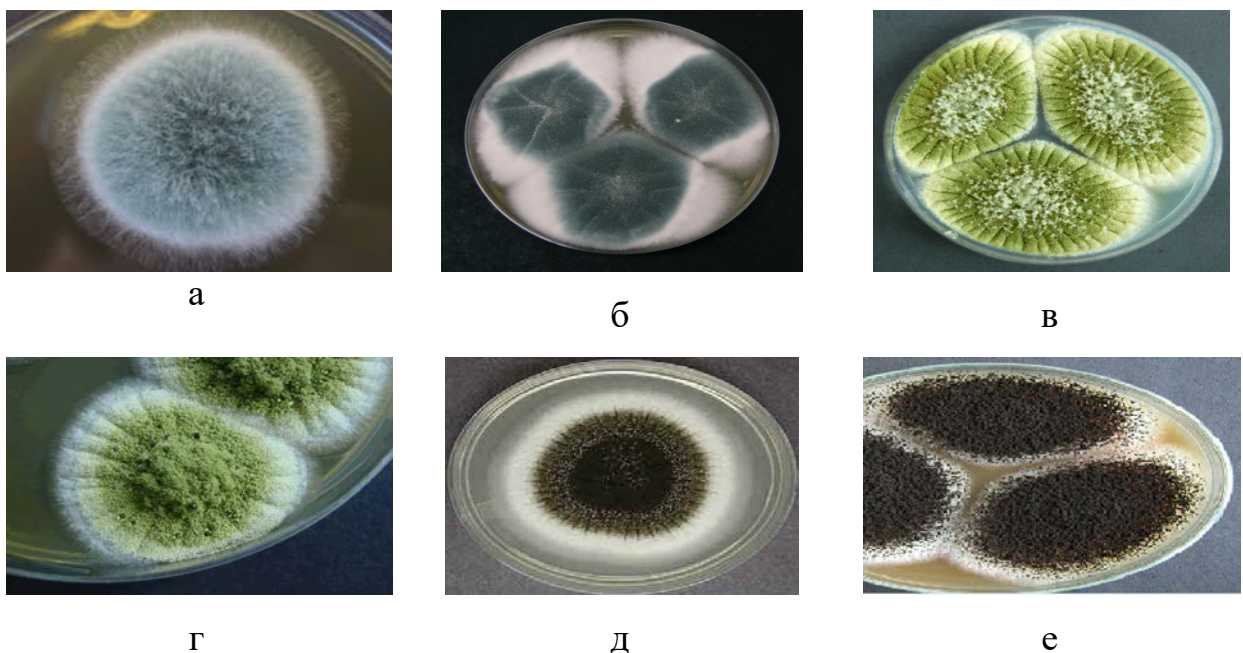


Рис. 2 Вигляд колоній у аспергилів різних видів:
а та б – *A. fumigatus*; в та г – *A. flavus*; д та е – *A. niger*.

Представники роду *Penicillium* мають добре розвинений, гіллястий, септований міцелій. Конідії розташовуються на кінцях підведених, розділених перетинками конідієносцев, які по формі нагадують кисть руки. На кінцях конідієносців закріплені довгі ланцюжки еліптичних або кулястих клітин зеленого, блакитного, сіро-зеленого кольору (рис.3). Тому так само, само як у аспергилів, колір центру та периферії колоній відповідає кольорам пігментів, що знаходяться в оболонках конідій даного вид (рис.4).

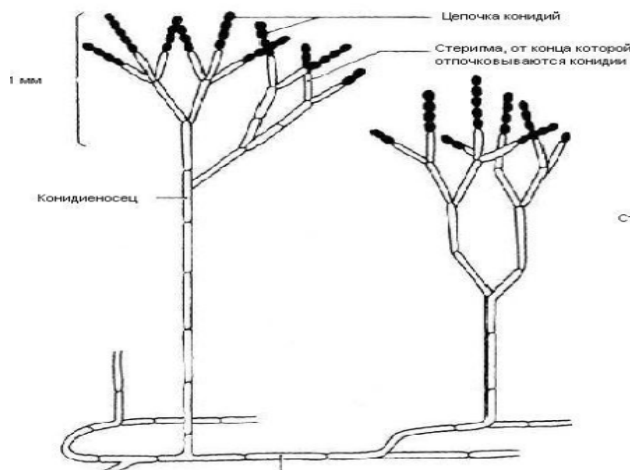


Рис.1 Морфологічні ознаки (септовані гіфи, конідієносці) грибів роду *Penicillium*.



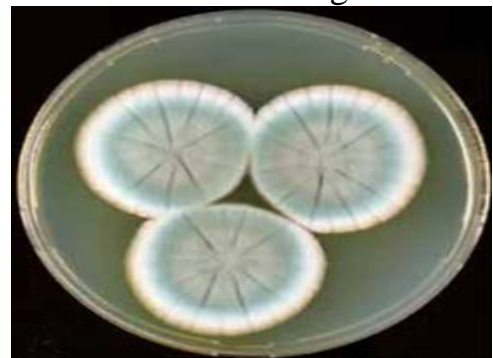
Penicillium solitum



Penicillium chrisogenum



Penicillium notatum



Penicillium rubens

Рис.4 Вигляд колоній у пеніцилів різних видів.

Представники роду *Fusarium* на гіфах міцелію (при вирощуванні у відповідних умовах) мають декілька видів репродуктивних структур, представлених на рис. 5:

- макроконідії характерної форми і структури (серповидні або ланцетовидно, з 3-7 перетинками всередині);
- одноклітинні мікроконідії (еліптичні або у формі лимона, груші, з 1-3 перетинками);
- в матеріалі старих колоній часто наявні хламідоспори декількох типів, утворених при розпаді гіфів (вегетативне розмноження).

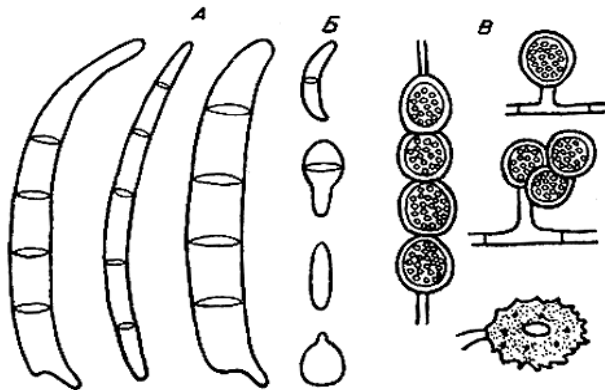


Рис.5 Репродуктивні структури

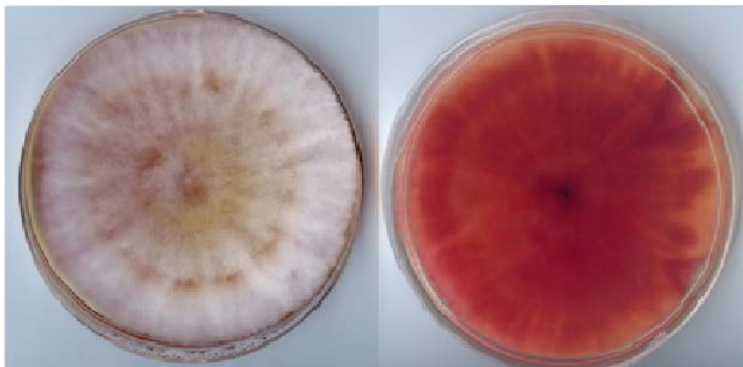
фузаріїв:

а – макроконідії;

б – мікроконідії;

в – хламідоспори.

Колонії грибів даного роду характеризуються кльочкуватою, павутинною структурою поверхні, нерівним краєм, жовтуватим кольором центральної частини, біло-рожевою, або жовто-зеленою периферією. Представники роду виділяють яскраві екзопігменти, тому навколо молодих колоній поживне середовище забарвлюється в жовто-червоний колір, а навколо зрілих – в червоно-коричневий (рис. 6).



Fusarium culmorum (верх та зворотній бік)



Fig. 1: *Fusarium chlamidosporium* SPFS2-g colony.

Fusarium chlamidosporium

Рис.6 Колонії з інтенсивним виділенням пігментів у грибів роду *Fusarium*.

Гладкі чи бугорчасті пігментовані та сегментовані конідії грибів роду *Alternaria* мають дуже специфічну яйцевидну чи циліндричну форму, у верхній частині – тонку шийку. Можуть бути поодинокими, розгалуженими, збиратись в ланцюжки. Колонії альтернарій – сірі, коричнево-чорні або сіро-чорні (рис. 7).

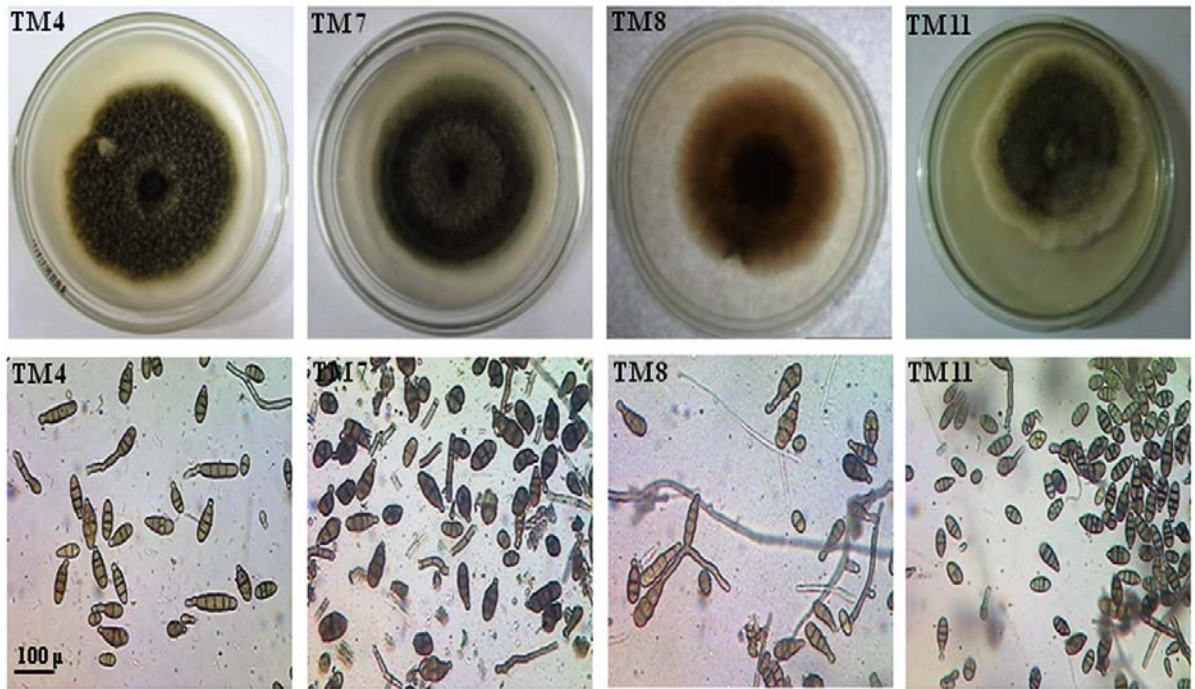


Рис.7 Колонії різних видів грибів з роду *Alternaria* (верхній ряд) та конідії характерної форми (нижній ряд).

Одною із фізіологічних властивостей зазначених грибів є синтез токсичних екзометаболітів (мікотоксинів). Ці речовини класифікують, спираючись на їх хімічну структуру: полікетиди, терпени, похідні шикимової кислоти чи амінокислот [22]. Різноманітність будови токсинів пов'язана з наявністю у міксоміцетів великої кількості шляхів метаболізму, яна яких ці сполуки і утворюються (реакції конденсації, окислення, відновлення, галогенування та інші).

Найважливішими мікотоксинами, що виділяються представниками роду *Aspergillus* в широкому діапазоні температур, вологості чи кислотності середовища, є афлатоксини (B1, B2, G1, G2 та інші заміщені кумарини);

охратоксин А (ОТА), стеригматоцистин та циклопіазонова кислота, треморові токсини (верукулоген та фумітреморгін С) [7, 8, 22-28].

Афлатоксини продукують види *A. flavus*, *A. parasiticus* і *A. nomius*, *A. niger*, стеригматоцистин – *A. versicolor* та *A. nidulans*, циклопіазонову кислоту – *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. phoenicis*, *A. clavatus*, *A. fumigatus*. Лише до синтезу охратоксину А здатен *A. ochraceus*. Гриби даного роду можуть виділяти і декілька токсинів одночасно: афлатоксини і циклопіазонову кислоту (*A. flavus*), афлатоксини та охратоксин (*A. niger*), циклопіазонову кислоту і треморові токсини (*A. flavus*, всі ізоляти *A. fumigatus*) тощо.

Різні види р. *Penicillium* продукують 27 мікотоксинів, і три з них вважаються самими небезпечними: охратоксини – (ізокумарини, зв'язані з фенілаланіном); патулін (гідроксифуран) та цитринін. Патулін продукує *P. expansum*, цитринін – *P. citrium*, *P. expansum* та *P. verrucosum*, охратоксин А – *P. verrucosum* та інші. Таким чином, пеніцили також здатні до одночасного утворення декількох токсинів.

Види роду *Alternaria* у відповідних умовах синтезують альтернаріол, його похідні та теназонову кислоту (найбільше – *Alternaria alternata*). Для названих токсинів нормативи ще розробляються, і спеціалісти Європейського Союзу вважають, що дані речовини мають виявлятися лише в продуктах дитячого харчування на основі злаків, а не в кормах для тварин. Але науковці компанії «Фітоконтроль» вже розробили кількісні методи для виявлення токсинів альтернацій в різних видах зерна.

Але найбільш економічно значимими щодо синтезу мікотоксинів є представники роду *Fusarium*, які потрапляють на зернини ще до збору врожаю. В країнах з помірним кліматом вони продукують мікотоксини, найважливішими з яких слід вважати терпенові сполуки-трихотецени, яких виявлено більше 100 штук (тип А, тип В). Трихотецени типу А – це Т-2 токсин, НТ-2 токсин, неосоланіол і діацетоксисцирпенол (ДАС), які синтезують види *F. sporotrichioides*, *F. roae*. Трихотеценами типу В є деоксініваленол (ДОН), ніваленол та фузареноном-Х, утворені *F.*

graminearum та *F. culmorum*. Найпоширенішим серед грибів даного роду є фузарієва кислота (індикаторний токсин для кормів, який свідчить про значну контамінацію фузаріями), а також – фумонізени та моніліформін (активно синтезуються *F. moniliforme*) та зеараленон.

Висновки до розділу 1

Зернові кормові культури, вирощені на вітчизняних полях, зазвичай, контаміновані певними видами біогенних забруднювачів (мікроміцетами, і можливо – їх токсинами). Останні належать до різних класів органічних речовин, а їх спектр та кількість визначається не лише умовами збору чи зберігання корму, але й – генетичними властивостями грибів певного роду чи виду.

Загальновідомо, що зернові корми контаміновані зародками одно і багатоклітинних міцеліальних грибів. Ними в зрілих культурах є конідії різних типів та спорангіоспори – структури для нестатевого розмноження; в старих культурах – хламідо-, бласто- та артроспори, утворені під час вегетативного розмноження гіф.

Виявлення реального мікробного пейзажу зернових кормів певного регіону, накопичення інформації щодо змін поверхневих мікробних асоціацій під дією температурних факторів є надзвичайно актуальним для тваринництва. Перехід від малих господарств до підприємств закритого циклу із величезними потужностями потребує не лише нарощування виробництва, але й приділення серйозної уваги питанням безпеки продукції. Велика кількість грибів з токсигенними властивостями суттєво знижує якість кормів, продовольчої сировини та харчових продуктів.

РОЗДІЛ 2 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали і методи досліджень

В роботі досліджували мікробний пейзаж поверхні зерен фуражної пшениці. Даний вид концентрованого корму використовують як компонент раціону для свиней в господарстві замкненого циклу, яке функціонує в Черняхівському районі Житомирської області. Досліджувану пшеницю було зібрано влітку 2020 року і використано як складову раціону свиней через рік.

Для отримання середньої проби пшеницю відбирали з верхнього, середнього та нижнього шарів насипу стерильним металевим совком [29,30]. Зерна масою близько 1 кг переносили у стерильний паперовий пакет. В асептичних умовах боксу навчально-наукової лабораторії факультету ветеринарної медицини (ФВМ) Поліського національного університету вміст пакету поміщали на стерильну фольгу і формували прямокутник. З такого зразка зерна, методом квадрату, стерильними паперовими стаканчиками відбирали зерна загальною масою 350 г. Їх переносили в стерильний хімічний стакан, перемішували. Поверхневі висіви на агарові поживні середовища загального призначення та подальші дослідження здійснювали з частини підготовленої проби (рис.8).

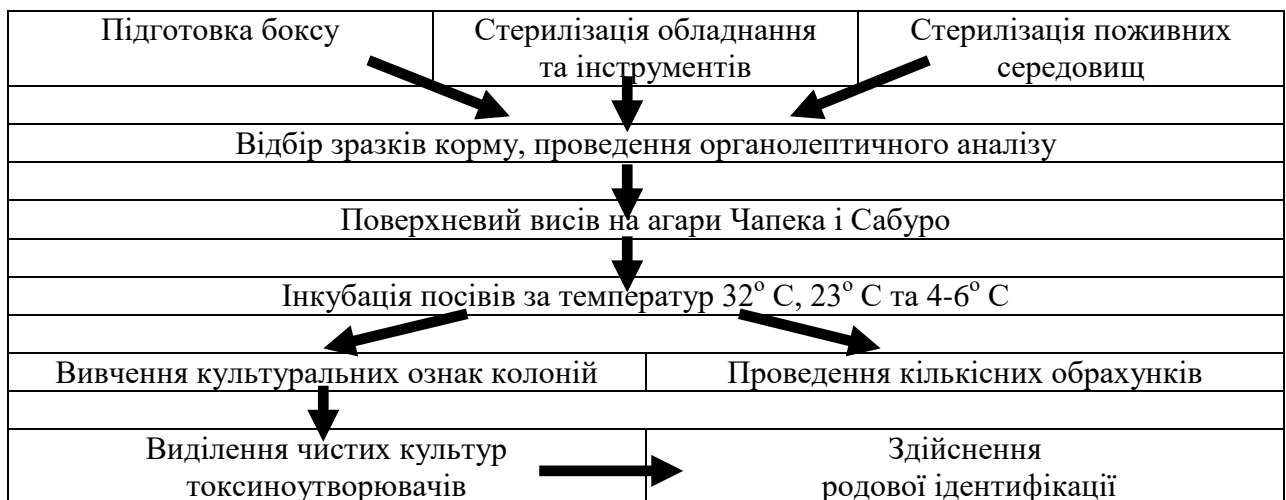


Рис.8 Схема дослідження

Середовищами, на яких виявляли мікроорганізми з поверхні зерен, були агари Чапека та Сабуро [31,32]. Для обліку загальної кількості грибів доцільно використовувати універсальні, дешеві, легкі в приготуванні середовища, які б не обмежували розвиток певних видів.

Використаний для висівів агар Чапека (АЧ) належить до синтетичних середовищ, містить ряд неорганічних солей (NaNO_3 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) і лише одну органічну сполуку – сахарозу в якості єдиного джерела карбону та енергії. Агар Сабуро (АС) є напівсинтетичним середовищем, природними органічними речовинами якого є пептон та дріжджовий екстракт, а хімічною речовиною – глюкоза. Пептон слугує джерелом амінокислот та пептидів, глюкоза – джерелом енергії, а дріжджовий екстракт забезпечує мікроорганізми вітамінами та мікроелементами. Ріст бактерій у використаному варіанті АС подавляє антибіотик. Тому висів на дані середовища моделює розвиток мікробних асоціацій в умовах зволоження та забезпечення незначною/значною кількістю органічних речовин, що потрапили на зерно.

Необроблені зернини стерильним пінцетом розкладали на поверхні середовища в чашках Петрі так, щоб вони не торкались одна одної (по 5 шт., в 10-ти повторях), висіви поміщали в термостат (23°C і 32°C) або в холодильник ($4-6^\circ\text{C}$). Повний перелік матеріалів та обладнання, використаних для різних видів досліджень, представлені на рис. 9.

Вид досліджень (процедур)			
мікологічні (поверхневий висів)	опис культуральних ознак, обрахунки	висів чистих культур токсинуотворювачів (поверхневий висів штрихом або уколом)	мікроскопічні (просте фарбування)
скляні чашки Петрі, колби з середовищами ($V=250-1000\text{ см}^3$), металеві пінцети, спиртівка	лупи з різним збільшенням, спиртівка	чашки Петрі (порожні та з накопичувальними культурами), колби з середовищами, мікробіологічні голки і петлі (метал чи пластик), спиртівка	предметні скельця, вода, розчини барвників, спиртівка, імерсійне масло, спирт, мікроскоп

Рис. 9 Матеріали та обладнання для вивчення поверхневої мікробіоти зерен

Вибір температур культивування визначали кліматичні умови на території Житомирської області (табл. 1). В період збору пшениці (15.07.20 р. – 6.08.20 р.) денна температура повітря складала $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$ (5 днів – 21,7% від тривалості періоду) або $(24\pm 2)^{\circ}\text{C}$ (12 днів – 52,2% від тривалості періоду). Нічні температури в зазначений період найчастіше знаходились в інтервалі $(15\pm 2)^{\circ}\text{C}$ (16 днів – 69,6% від тривалості періоду). Саме тому, після аналізу даних веб-сайту World-weather було вирішено, що інкубація зерен середньої проби має проводитись за тих температур, в яких в влітку 2020 р. могли розвиватись ґрунтові мікроорганізми, здатні рости на агарах Чапека і Сабуро (23°C та 32°C).

Таблиця 1 Коливання температури в період збору досліджуваної пшениці

Дата	Температура, $^{\circ}\text{C}$		Різниця температур $^{\circ}\text{C}$	Інтервали, $^{\circ}\text{C}$ *		
	ніч	день		нічна (15 ± 2)	денна (24 ± 2)	денна (30 ± 2)
15.07	14	21	7			
16.07	13	24	11			
17.07	16	24	8			
18.07	15	26	11			
19.07	16	26	10			
20.07	15	27	12			
21.07	17	21	4			
22.07	16	23	7			
23.07	13	22	9			
24.07	15	23	8			
25.07	17	24	7			
26.07	17	26	9			
27.08	18	28	10			
28.07	18	28	10			
29.07	18	30	12			
30.07	18	25	7			
31.07	17	22	5			
1.08	14	19	5			
2.08	12	20	8			
3.08	12	24	12			
4.08	16	27	11			
5.08	15	29	14			
6.08	18	30	12			

*кольором позначені відповідні періоди часу у визначених температурних інтервалах

Стерилізацію обладнання здійснювали в лабораторіях факультету ветеринарної медицини. Чистий скляний посуд та металеві предмети обробляли в сушильній шафі загорнутими в папір чи у фольгу впродовж 1-1,5 год. при 165-170° С. Агари Чапека та Сабуро виготовляли згідно настанов та стерилізували автоклавуванням. Металеві пінцети, мікробіологічні голки та петлі при безпосередньому використанні додатково обпалювали на вогні (фламбували).

Належність мікробів до певної групи/підгрупи визначали під час докладного опису тих культуральних ознак колоній, які є найбільш характерними для представників морфологічної групи «Гриби». Тому особливу увагу звертали на їх розмір (великі, середні, дрібні); колір та структуру поверхні центральної частини і периферії; колір та вигляд країв, вигляд зворотного боку колоній – реверсуму [16, 33].

Для отримання чистих культур матеріал відповідних колоній пересівали штрихом або уколом. При посіві штрихом петлю фламбували, охолоджували впродовж 15 с в чистому агарі, набирали мікробний матеріал, проводили по поверхні середовища одиночний прямий штрих. При посіві уколом профламбованою та охолодженою бактеріологічною голкою також набирали мікробний матеріал і поміщали його в центр поживного середовища в чашці Петрі.

Родову належність ізолятів грибів встановлювали, порівнюючи їх ознаки з описами, наведеними в оглядах, авторських статтях, підручниках з мікології [16, 34-41].

2.2 Результати власних досліджень

2.2.1 Особливості розвитку мікробної асоціації на агарі Чапека.

Розвиток представників мікробної асоціації з поверхні зерен на агарі Чапека (АЧ) за різних температур дещо відрізнявся. На 5-у добу інкубації при 23°C, чіткі культуральні ознаки, характерні для зрілих угруповань реєструвались всього у 14,6% грибних колоній, а при 32°C – у 100% (рис.10,11).



а



б



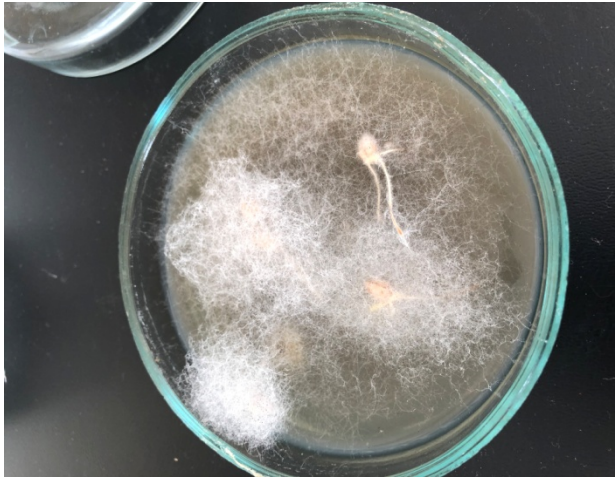
в



г

Рис.10 Культуральні ознаки грибних колоній, вирощених навколо зерен на 5-ту добу інкубації:

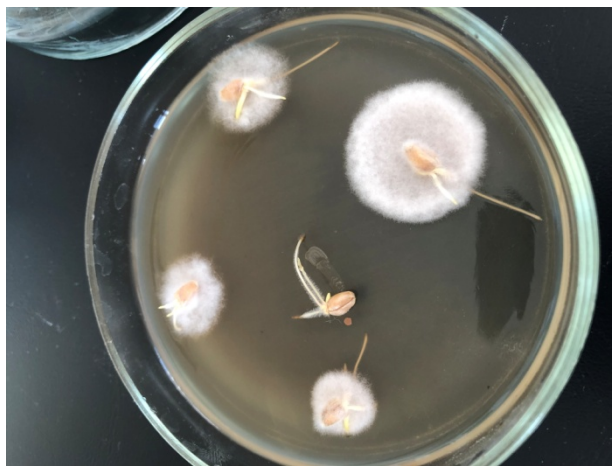
а, б – молоді колонії грибів при 23°C; в,г – зрілі колонії грибів при 32°C.



а – п'ята доба



б – десята доба



в – п'ята доба



г – десята доба

Рис.11 Зміни культуральних ознак та кількості мікробних колоній при культивуванні посівів при 23° С: а та б — чашка №10; в та г — чашка №6.

Після 7-ї доби чашки Петрі, інкубовані при різних температурах, перенесли в приміщення стаціонарного боксу. Температура 15°С, наявна в ньому, імітувала погіршення температурних умов влітку. Це дозволяло перевірити здатність певних видів продовжувати ріст за нічних температур в період збору пшениці. Остаточний облік результатів проводили в посівах, культивованих при 32°С на п'яту, а при 23°С – на п'яту та десятю добу (табл.2-3).

Таблиця 2 Ріст мікробів з поверхні зерен на АЧ при 32 °С (5-а доба)

№ чашки з/п	Уражено зерен, шт.	Обсіменіння, %	КУО/ чашку	З них		
				міцеліальні гриби	дріжджові гриби	бацили
1	4	80%	4	3	—	1
2	5	100%	8	8	—	—
3	5	100%	7	4	2	1
4	4	80%	5	3	2	—
5	3	60%	4	1	1	2
6	4	80%	7	3	1	3
7	5	100%	7	6	—	1
8	5	100%	6	6	—	—
9	5	100%	8	5	1	2
10	5	100%	9	8	1	—
Всього	45	середнє (90±4,5)%	65 шт., середнє (6,5±0,54)	47	8	10

Таблиця 3 Ріст мікробів з поверхні зерен на АЧ при 23 °С (5-10 доба)

№ чашки з/п	Уражено зерен, шт.		Обсіменіння (5-10 доба), %	КУО/ чашку	
	5 доба	10 доба		5 доба	10 доба
1	4	4	80%	4	5
2	5	5	100%	9	10
3	5	5	100%	7	12
4	3	4	60-80%	6	7
5	5	5	100%	8	14
6	4	5	80-100%	5	9
7	5	5	100%	5	5
8	4	5	80-100%	5	13
9	5	5	100%	6	9
10	5	5	100%	7	13
Всього	45	47	від (90 ± 4,5)% до (96 ± 2,7)%	62 шт., середнє (6,2 ± 0,49)	97 шт., середнє (9,7 ± 0,99)

При 15°С мікроби, попередньо вирощені при 32°С, припинили розвиток. Але зниження температури на 8° не вплинуло на мікроби, раніше культивовані при 23°С, і до 10-ї доби тривали певні зміни культуральних ознак та з'являлись нові колонії (табл.3).

Таким чином, зрозуміло, що на 5-ту добу вирощування, принципово різною характеристикою висівів була лише незрілість (повільний розвиток) колоній міцеліальних грибів, що розвивались при 23°С (80% мікроміцетів з поверхні зерен). Висновок щодо наявності різних видів, здатних розвиватись

за різних температур, можливо зробити лише після повного дозрівання колоній і порівняння мікробних пейзажів у висівах. При цьому дані таблиць 2 та 3 свідчать, що інші значущі показники на 5-ту добу росту достовірно не відрізнялись:

1. рівень обсіменіння зерен і при одному, і при другому режимі складав $(90 \pm 4,47)\%$;

2. середня кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) на чашку Петрі дорівнювала $(6,2 \pm 0,49)$ при 23°C та $(6,5 \pm 0,54)$ при 32°C .

Вищезазначене порівняння стало можливим після 10-ї доби росту зразків. На цей момент мікроби в посівах, вирощених при 32°C , вже не розвивались, а в чашках, культивованих при 24°C – ріст продовжувався.

Таблиця 4 Зміни мікробного пейзажі зерен при рості на АЧ при 23°C .

№ чашки з/п	КУО/ чашку, доба		Кількість колоній різних видів, в шт. на певну добу					
			міцеліальні гриби		дріжджові гриби		бацили	
	5-та	10-та	5-та	10-та	5-та	10-та	5-та	10-та
1	4	5	3	4	1	1	—	—
2	9	10	8	9	1	1	—	—
3	7	12	6	10	1	2	—	—
4	6	7	4	5	1	1	1	1
5	8	14	7	12	1	2	—	—
6	5	9	4	8	1	1	—	—
7	5	5	4	4	—	—	1	1
8	5	13	4	10	—	2	1	1
9	6	9	6	6	—	3	—	—
10	7	13	7	11	—	2	—	—
Всього	62	97	53	79	6	15	3	3



Рис. 12 Зміни вигляду і кількості колоній в чашці №5 при 23°C .

Через 2 тижні росту у всіх чашках Петрі проаналізували структуру мікробної асоціації, виявленої на поверхні зерен (рис.13).

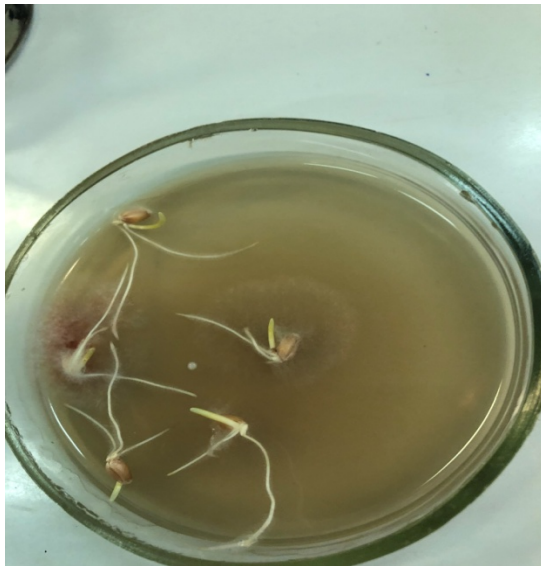
Ріст колоній мікробів навколо зерен на агарі Чапека (шт. та % від загальної кількості виявлених угруповань)					
23°C, 97 колоній загалом			32°C, 65 колоній загалом		
20 шт. окремих (20,6%)			22 шт. окремих (33,9%)		
бацили 2 шт. (2,1%)	дріжджі 2 шт. (2,1%)	міцеліальні гриби 16 шт. (16,5%)	бацили 4 шт. (6,2%)	дріжджі 3 шт. (4,6%)	міцеліальні гриби 15 шт. (23,1%)

Рис. 13 Розвиток окремих колоній навколо зерен за різних температур.

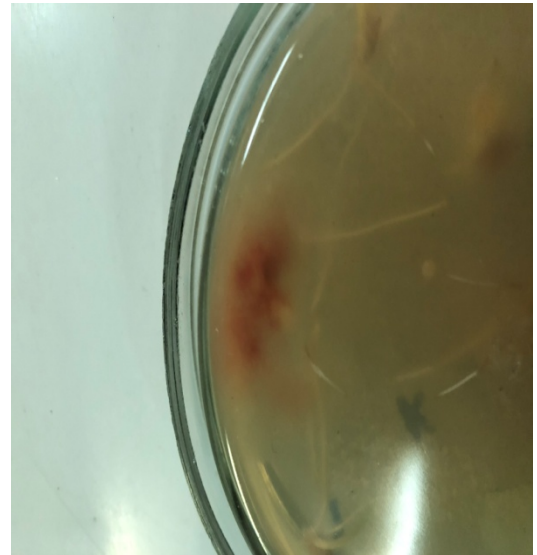
При будь-якій температурі, в момент припинення розвитку накопичувальних культур, більша частина угруповань представляла собою злиті чи багат шарові колонії, які найчастіше були складені з 2-х, рідше з 3-х, колоній міцеліальних грибів:

- ріст при 23°C. 77 колоній – 79,4% від загальної кількості колоній в чашках Петрі. Належить до бацил 1 шт., до дріжджових грибів – 13 шт., до міцеліальних грибів – 63 шт.;
- ріст при 32°C. 43 колонії – 66,1% від загальної кількості колоній в чашках Петрі. Належить до бацил 10 шт., до дріжджових грибів – 5 шт., до міцеліальних грибів – 32 шт.

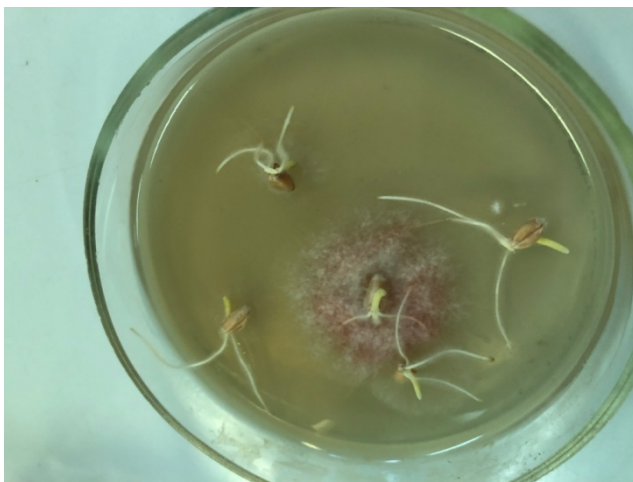
В зразках, вирощених при температурі 4-6°C ні на 5-ту, ні на 10-ту добу інтенсивного розвитку колоній не спостерігали. На жаль, навколо 2-х зерен, вже на 5-ту добу, можна було зафіксувати клочкуваті білі, з пігментованим реверсумом колонії фузаріїв. Їх присутність на зернах не викликає сумнівів, але для проростання їм імовірно найкраще підходять умови складського збереження (рис.14).



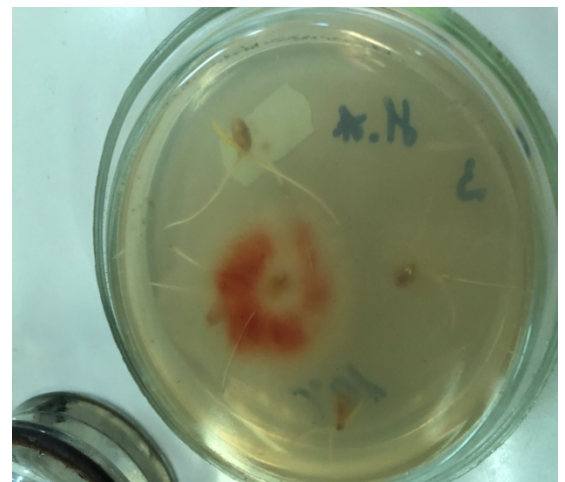
а



б



в



г

Рис. 14 Розвиток грибів роду на зернах при 10°C (агар Чапека, 3-4 доба після висіву): а,б – чашка №1; в,г – чашка №3.

16 шт. зерен з 40 перевірених взагалі залишились чистими (40%). Такі культуральні ознаки як початковий ріст гіф від центру колонії, ущільнення поверхні, появу ледь помітного кольору можна було зареєструвати у 24 поодиноких колоніях, які на 7-10 добу вирости на поверхні середовища (навколо 60% зерен).

2.2.2 Особливості розвитку мікробної асоціації на агарі Сабуро.

Перед проведенням висівів очікували, що наявність в даному середовищі органічних речовин у великій кількості призведе до активного росту мукоральних грибів, дріжджів та стрімкого розвитку зародків грибів. При цьому вважали, що останніх має виявлятися більше, ніж на агарі Чапека. Але дані табл.5 свідчать про те, що ні рівень обсіменіння зерен на 5 добу (при 23°C), ні кількість колонієутворюючих одиниць в перерахунках на 1 чашку достовірно не відрізнявся від такого на агарі Чапека. Різницю, тобто 100% розвиток зародків грибів на всіх зернах, відмічали лише на 10 добу від початку росту.

Таблиця 5 Ріст мікробів з поверхні зерен на АС при 23 ° С (5-10 доба)

№ чашки з/п	Уражено зерен, шт.		Обсіменіння, %		КУО/ чашку, шт.	
	5 доба	10 доба	5 доба	10 доба	5 доба	10 доба
1	4	5	80	100	6	7
2	5	5	100	100	5	9
3	5	5	100	100	8	6
4	4	5	80	100	11	11
5	4	5	80	100	5	9
6	4	5	80	100	4	6
7	4	5	80	100	6	7
8	5	5	100	100	11	11
9	4	5	80	100	6	низький газон
10	5	5	100	100	5	низький газон
Всього	44	50	(88±3,3)%	100%	67 шт., середнє (6,7±0,79)	—

Також на даному середовищі, на 5-ту добу росту, чіткі культуральні ознаки мали більше грибних колоній, ніж на агарі Чапека (30 шт. із 67 або 44,8%). Дивним було те, що серед угруповань на агарі Сабуро в цей час були відсутні колонії дріжджів, в 10-ти чашках Петрі виявили всього 2 колонії бацил, і у 80% засіяних чашок вирости маленькі колонії пеніцилів (рис.16).

На 10-добу росту угруповання суттєво постаріли, що все ж таки свідчило про інтенсивніший ріст при використанні органічних речовин (рис.17):

- значно збільшився діаметр колоній;

- у всіх 10-ти чашках не спостерігалось різниці в кольорі та структурі центральною та периферичною частини колоній;
- деякі колонії відрізнялись концентричним ростом, що означає розвиток декількох поколінь впродовж 10-денного терміну спостереження.



Рис. 16 Чіткі культуральні ознаки у колоній грибів різних видів
(в кожній чашці наявні колонії пеніцилів)



№2



№8

Рис.17. Суттєва зміна культуральних ознак на 10-ту добу росту:
а та б – збільшення розмірів колоній;
б – монотонна структура поверхні чорних колоній аспергилів;
а та б – інтенсивний концентричний ріст у зелених колоній (ч. №2), слабкий ріст – у колоній аспергилів (ч. №8)

Необхідно зазначити, що на 10-ту добу росту при 23°C достовірно визначити кількість КУО/чашку не вдалось. Справа в тому, що у чашках №9 та №10 виросли низькі щільні газони, які перекривали певні колонії. Загалом, в більшості чашок, що залишилась, спостерігалась тенденція до появи ізолятів, яких не було на початку культивування посівів. Так, в одній з чашок виросли 2 прозорі колонії дріжджів малого діаметру. Це означає, що за використаних умов (середовище із значною кількістю органічних речовин) можливий пізній ріст членів мікробної асоціації з іншим генетичним потенціалом до росту.

При 32°C на агарі Сабуро (АС), на 5 добу, на 40% зерен утворюються мікробні колонії. Так само, як і при 23°C, близько 100% колоній належить міцеліальним грибам. В цей час 58% угруповань мають малі розміри, а 43% утворюють великі і гігантські (газони) колонії. На 7-му добу, за появи чітких культуральних ознак, стає зрозуміло, що на АС розвивається 15 ізолятів мікроміцетів, які – через імовірний ріст споріднених штамів – належать 11 видам міцеліальних грибів (3 види утворюють газони, 4 види – дуже великі колонії, 4 види – середні). Цікаво, що при 32°C серед виділених ізолятів зустрічаються мукоральні гриби, пеніцили, декілька альтернатив і дуже незначна кількість темно-пігментованих аспергилів секції *Nigri*.

Культивування посівів на агарі Сабуро за низьких температур спочатку, на 3-5 добу, призводить лише до незначного розвитку 14 незрілих або малих за розмірами колоній (початкові стадії ураження всього 28% зерен - рис.18)

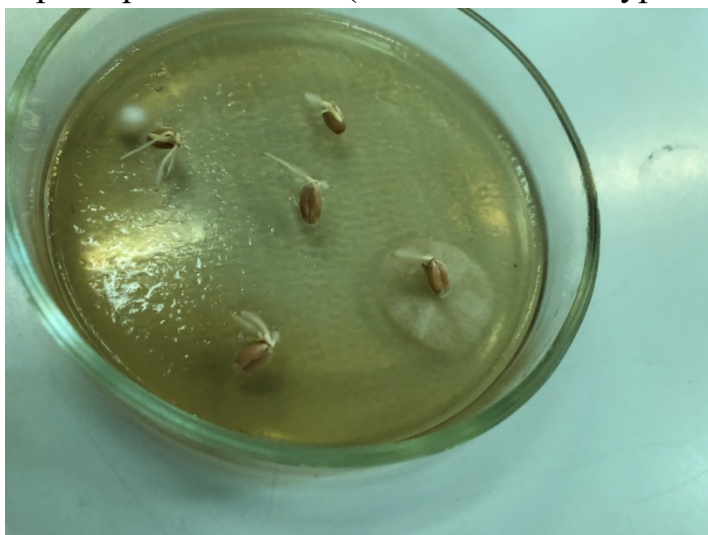


Рис. 18 Культуральні ознаки молодих колоній на агарі Сабуро при 4-6°C (5 – та доба).

На десяту добу ряд колоній дозріває. Всі вирощені ізоляти мають генетичні можливості до подальшого розвитку при низьких температурах (за умов наявності оптимально (при достатній вологості і забезпеченості різноманітними біополімерами в якості поживних речовин).

Висновки до розділу 2

За різних температур, на різних середовищах, на поверхні зерен перевагу отримують ті чи інші члени багатоконпонентної змішаної культури. Через це у різних висівах структури мікробних асоціацій дещо відрізняються. Імовірно, що представники мікробіоти найкраще розвиваються в інтервалі температур 15-23 ° С (інтенсивний розвиток великих за розмірами колоній, вкритих великою кількістю репродуктивних структур не припиняється при зниженні температури).

Розділ 3. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Виявляти мікробний пейзаж зернових кормів доцільно на загальних, дешевих, легких в приготуванні середовищах. Саме такими є агари Чапека і Сабуро, які дозволяють в певний термін виростати на них представникам певних видів, в різній кількості наявних в мікробних асоціаціях зерен фуражної пшениці.

Агар Чапека має лише сахарозу в якості єдиного джерела карбону та енергії, що дозволяє змоделювати розвиток потенційних збудників мікотоксикозів при незначній кількості органічних речовин. На даному агарі при 32°C розвивалась асоціація, в якій 40% колоній належало мукоральним грибам, а 12-13% — аспергілам декількох видів (з переважанням представників секції *Nigri*). При 23°C ситуація щодо структури асоціації принципово змінювалась. В таких умовах виростали 13-14% мукоральних грибів, 23-24 % аспергілів, до 30% альтернацій, поодинокі пеніцили.

Зниження температури культивування до 10°C впродовж 5-8 діб значно зменшує темпи росту грибів будь-яких видів, але дозволяє швидко розвиватись фузаріям.

Бацили 5-6 видів краще розвивались на агарі Чапека при 32°C, утворюючи розгалужені (зіркоподібні) гігантські колонії. За температури 23°C реєструвались інші види, які мали колонії неправильної форми з хвилястими краями та середній розміри. Ці бактерії могли потрапити на поверхню зерен з ґрунту чи при транспортуванні врожаю. Ґрунтові бацили багатьох видів стають резидентними контамінантами пшениці, оскільки присутні в ґрунтах сільськогосподарських угідь, де приймають участь у засвоюванні рослинами нітрогену.

На агарі Чапека (23°C) постійно виділялись ізоляти дріжджів з прозорими жовтими, кремовими, «медовими» колоніями; а на тому ж агарі (32°C) – ізоляти з світло-коричневими плоскими непрозорими блискучими

колоніями. Незважаючи на постійне виділення дріжджів 3-5 видів, можливо стверджувати, що на АЧ краще зростають не дріжджові, а міцеліальні гриби. За 23°C їх виявлено 81,4% від загальної кількості колоній, а за 32°C – 72,3%. Досить дивно, що на агарі Сабуро, при температурах вищих, ніж 15°C зростали лише поодинокі представники дріжджових грибів з прозорими краплеподібними колоніями, а перевагу знову мали міцеліальні гриби – пеніцили та *Aspergillus niger*.

Наш експеримент довів, що здатність міцеліальних грибів-конттамінантів до швидкого визрівання репродуктивних структур згасає в ряду 32°C — 23°C — 10°C (за використання будь-якого агару). Тому на 5-ту добу інкубації за 23°C на поживних середовищах фіксували появу молодих колоній, а за 32°C в ті ж строки – зрілих. Це пояснюється дією «стресу високих температур», коли мікроміцети, для власного виживання, прагнуть максимально швидко сформувати та поширити репродуктивні елементи у навколишньому середовищі.

Таким чином, за 23°C, на різних середовищах, утворюється приблизно в 3 рази менше мукоральних грибів, здатних до формування плівок типу «газон» і швидкого зараження зерна, ніж за 32°C. Натомість потенційних продуцентів мікотоксинів – грибів роду *Aspergillus* – за такої температури розвивається в 3 рази більше. Важливим також на нашу думку є той факт, що продовжувати ріст за нічних температур (15°C) були спроможні лише мікроби, вирощені за 23°C.

Висновок до розділу 3

Остаточне уявлення щодо можливостей отруєння тварин за використання пшениці з даної партії можна скласти після проведення токсикологічного дослідження та співставлення отриманих даних з кількістю токсинуотворювачів (аспергили, пеніцили, фузарії, альтернарії), виявлених в зразках корму.

ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ

1. Імітація високих добових літніх температур впродовж 5-ти діб стимулює ріст мукоральних грибів навколо зерен, у вигляді газонів різної висоти та щільності (на агарах з різною кількістю органічних речовин). Тому при приготуванні раціону за температур $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$ зерно пшениці потрібно вивантажувати із складських приміщень з низькою температурою через кожні 2-3 доби, а при температурі $(24\pm 2)^{\circ}\text{C}$ – через 5 діб.

2. Використання агарів Чапека і Сабуро за різних температур, надає перевагу тій чи іншій складовій мікробної асоціації зернин. За певних умов досить швидко розвиваються продуценти токсинів з родів *Aspergillus* (агари Чапека та Сабуро – 23°C), *Penicillium* (агар Сабуро – 23°C), *Fusarium* (агар Чапека – 10°C) та *Alternaria* (агар Чапека – 23°C та 32°C , агар Сабуро – 23°C). Ріст певних ізолятів токсиноутворювачів продовжується при зниженні температури культивування до 15°C та $4-6^{\circ}\text{C}$.

3. За умов зволоження і потрапляння на зерно поживних речовин під час складського зберігання такі продуценти мікотоксинів як гриби роду *Fusarium* доцільно виявляти при $4-10^{\circ}\text{C}$ на агарі Чапека.

4. Для максимального виявлення мікробного (грибного) пейзажу зерен фуражної пшениці в діагностичних лабораторіях доцільно застосовувати і агар Чапека, і агар Сабуро. Вибір температури вирощування зразків залежить від періоду року, в який даний зерновий корм буде подрібнено і використано в якості компоненти раціону.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Кураков А.В. Роль грибов в глобальном круговороте азота. Микология сегодня / Ю.Т. Дьяков, А.Ю. Сергеев (ред.). М.: Национальная академия микологии, 2011. Том 2. С.58-88.
2. Ставишенко И.В. Основные закономерности преобразования сообществ ксилотрофных грибов под воздействием антропогенных и природно-климатических факторов. Микология сегодня / Ю.Т. Дьяков, А.Ю. Сергеев (ред.). М.: Национальная академия микологии, 2011. Том 2. С.89-108.
3. Д.Ю. Александров, А.В. Александрова. Особенности видового состава микромицетов, распространяемых на шерсти мелких млекопитающих. Микология сегодня / Ю.Т. Дьяков, А.Ю. Сергеев (ред.). М.: Национальная академия микологии, 2011. Том 2. С.115-125.
4. Терёшина В. М., Меморская А.С., Котлова Е.Р., Феофилова Е.П. Адаптация *Aspergillus Niger* к тепловому стрессу: роль углеводов и липидов мембран. Микология сегодня / Ю.Т. Дьяков, А.Ю. Сергеев (ред.). М.: Национальная академия микологии, 2011. Том 2. С.171-177.
5. Карамова Н.С., Надеева Г.В., Багаева Т.В. Методы исследования и оценки биоповреждений, вызываемых микроорганизмами: Учебно-методическое пособие. Казань: Казанский университет, 2014. 36 с.
6. Сухаревич В.И. Кузикова И.Л., Медведева Н.Г. Защита от биоповреждений, вызываемых грибами. Санкт-Петербург: ЭЛБИ-СПБ, 2009. 207 с.
7. Bryła M., Ksieniewicz-Woźniak E., Yoshinari T., Waśkiewicz A., & Szymczyk K. Contamination of Wheat Cultivated in Various Regions of Poland during 2017 and 2018 Agricultural Seasons with Selected Trichothecenes and Their Modified Forms. *Toxins*, 2019. 11(2):88. doi: <https://doi.org/10.3390/toxins11020088>
8. Chelkowski, J., Wisniewska, H., Adamski, T., Golinski, P., Kaczmarek, Z., Kosteki, M., Perkowski, J., & Surma, M. Effects of *Fusarium culmorum* head

blight on mycotoxin accumulation and yield traits in barley doubled haploids. *J. Phytopathol*, 2000. 148, 541–545.

9. Hooke D.C., Schaafsma A.W., & Tamburic-Ilincic L. Using weather variables pre- and post-heading to predict deoxynivalenol content in winter wheat. *Plant Dis.*, 2002. 86, 611–619.

10. Hu F., Tu X. F., Thakur K., Hu F., Li X. L., Zhang Y. S., ... & Wei Z. J. Comparison of antifungal activity of essential oils from different plants against three fungi. *Food and Chemical Toxicol.*, 2019. 134, 110821. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110821>

11. R. Gashgari, F. Ameen et all. Mycotoxigenic fungi contaminating wheat; toxicity of different *Alternaria compacta* strains. *Saudi J. Biol. Sci.*, 2019. 26. [10.1016/j.sjbs.2018.10.007](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.10.007)

12. F. Ameen et all. Desert soil fungi isolated from Saudi Arabia: cultivable fungal community and biochemica production. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2022, P. 2-12 (in press). Веб-сайт. [URL:https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X21010445](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X21010445)
(дата звернення — 25.01.2022).

13. Гаврилов А. А., Стародубцева Г. П., Марюхина А. Г., Топчий М. В. МИКОКАРБ для защиты зерна озимой пшеницы от алесени и микотоксинов. Успехи медицинской микологии. Т.1. Гл.4. С.28-34.

14. Nagorna, L., Poscurina, I., & Nesteruk, V. (2020). Monitorynh mikolohichnoho zabrudnennya kormiv v Sums'kiy oblasti. [Monitoring of mycological contamination of feed in Sumy region]. **In** III All-Ukrainian scientific and practice Internet conference "Modern problems of biosafety in Ukraine" (pp. 44 - 46). Poltava, Ukraine. (in Ukrainian).

15. Маннапова Р.Т. Микробиология и иммунология. Учебное пособие. Москва: ГЭОТАИ-Медиа, 2013. 348 с.

16. Маннапова Р.Т. Микробиология и микология. Особо опасные. Инфекционные болезни, микозы, микотоксикозы. Москва: Проспект, 2018. 440 с.

17. Шлегель Г. Современная микробиология. Москва: Мир, 2002. 567 с.
18. Leslie John F., Brett A. Summerell. *Fusarium laboratory manual*. First edition. Oxford (UK): Blackwell Publishing Ltd., 2006. 388 p.
19. Мюлер Э., Лефлер В. Микология: Пер. с нем. Москва: Мир, 1995. 134 с.
20. Гарибова Л.В., Лекомцева С.Н. Основы микологии: Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов. Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2005. 225 с.
21. Переведенцева Л.Г. Микология: грибы и грибоподобные организмы: учебное пособие. Пермь: Пермский гос. ун-т., 2009. 199 с.
22. Екологічна біохімія: Навч. посібник /В.М. Ісаєнко, В.М. Войціцький, Ю.Д. Бабенюк та ін. Київ: Книжкове видавництво НАУ, 2005. 440 с.
23. Cromeu, M.G., Shorter, S.C., Lauren, D.R., & Sinclair, K.I. (2002). Cultivar and crop management influences on fusarium head blight and mycotoxins in spring wheat (*Triticum aestivum*) in New Zealand. *N. Z. J. Crop Hort. Sci.* 30, 235–247.
24. Абраскова С.В., Шашко Ю.К., Шашко М.Н. Биологическая безопасность кормов. Минск.: Беларуская навука, 2013. 257 с.
25. Макарчук М. О. Мікотоксини – накопичення у зерні та їх згубний вплив. *Modern science and practice*, 2020. С. 286-288.
26. Микотоксины. Информационный бюллетень ВООЗ, 2018. Всемирная Организация здравоохранения. Глобальный веб-сайт. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/natural-toxins-in-food> (дата звернення – 10.12.2021 р.)
27. Хмельницкая И.И., Винокурова Н.Г., Баскунов Б.П., Аринбасаров М.У. Грибы рода ASPERGILLUS: распространение, синтез микотоксинов. Успехи медицинской микологии. Т.1. Гл.4. С. 137-139.
28. Токсины Альтернария. Phytocontrol. Веб-сайт. URL: <https://www.phytocontrol.com/ru/без-категории/токсины-альтернария-лаборатория-phytocontrol-o/>(дата звернення – 10.12.2021 р.)

29. Dekalenko V. Vidbir prob vid partiy nasinnya dlya provedennya sertyfikatsiyi. Rekomendatsiyi. Main Department of the State Food and Consumer Service in Cherkasy Oblast. Веб-сайт. URL: <https://www.cherk-consumer.gov.ua/hromadianam/upravlinnia-fitosanitarnoi-bezpeky/novyny-upravlinnia-fitosanitarnoi-bezpeky/1958-vidbir-prob-vid-partii-nasinnia-dlia-provedennia-sertyfikatsii-rekomendatsii> (дата звернення —17.01.2022).

30. Yaschuk N. Pravylnyy vidbir prob zerna ta nasinnya dlya analizu sil'hospkul'tur. Propozytsia. Tehnologii. Веб-сайт. URL: <https://propozitsiya.com/ua/pravilniy-vidbir-prob-zerna-ta-nasinnya-dlya-analizu-silgospkultur> (дата звернення —17.01.2022).

31. Научный центр Himedia. Готовые питательные среды. Агар Чапека (для грибов). Вебсайт. URL: <http://www.himedialabs.ru/m075-m076> (дата звернення — 20.12.2022).

32. Научный центр Himedia. Готовые питательные среды. Агар Сабуро. Вебсайт. URL: <http://www.himedialabs.ru/m1067-m063> (дата звернення — 20.12.2022).

33. Методические рекомендации. «Микологические культуральные исследования». Санкт-Петербург: НИИ медицинской микологии им. П.Н.Кашкина, 2013. 47 с.

34. Omotayo O. P., Omotayo A. O., Mwanza M., & Babalola O. O. Prevalence of mycotoxins and their consequences on human health. *Toxicological research*, 2019. 35(1). 1-7. doi: <https://doi.org/10.5487/TR.2019.35.1.001>

35. Santos Pereira, C. C. Cunha, & Fernandes J. O. Prevalent mycotoxins in animal feed: Occurrence and analytical methods. *Toxins*, 2019. 11(5), 290. <https://doi.org/10.3390/toxins11050290>

36. Oliveira P. M., Zannini E., & Arendt E. K. Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. *Food Microbiol.*, 2014. 37., 78–95. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.003>

37. Mucha J., Peay K. G., Smith D. P., Reich P. B., Stefański A., & Hobbie S.E. Effect of simulated climate warming on the ectomycorrhizal fungal community of boreal and temperate host species growing near their shared ecotonal range limits. *Microbial ecology*, 2018. 75(2), 348-363. doi: <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1044-5>

38. Krasauskas A. Fungi isolated from maize (*Zea mays* L.) grain in Lithuania. *Žemės ūkio mokslai*, 2018. 25(4), 169-176. doi: <https://doi.org/10.6001/zemesukiomokslai.v25i4.3866>

39. Sandrine Pigne, Agata Zykwincka, Etienne Janod, Stephane Cuenot et al. A flavoprotein supports cell wall properties in the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Fungal Biol Biotechnol*, 2017, 4:1 DOI 10.1186/s40694-016-0029-3.

40. Maria Cristina Lopes, Victor C. Martins. Fungal plant pathogens in Portugal: *Alternaria dauci*. *Rev Iberoam Micol.*, 2008. 25: 254-256.

41. Далинова. А. А., Салимова Д. Р., Берестецкий А. О. Грибы рода *Alternaria* как продуценты биологически активных соединений и биогербицидов (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*, 2020, том 56. № 3. с. 223–241.

42. Ярошенко М. О. Плісневі сапрофіти – біотичні контамінанти кормів як можливе джерело мікозів сільськогосподарської птиці. *Науковий вісник НУБІП України. Ветеринарна медицина*, 2016. Вип. 102. С. 235-240.