

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ПОЛІСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет ветеринарної медицини
Кафедра мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології

Кваліфікаційна робота на
правах рукопису

Смуров Гліб Олександрович

УДК: 636.02:636.2

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

Мікологічна якість готових раціонів для відгодівлі свиней різного віку

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.

Г. О. Смуров

Керівники роботи:

Солодка Л. О.,
к. біол. наук, доцент

Кривда М.
к. вет. наук, ст. викладач

АНОТАЦІЯ

Смуров Г.О. Мікологічна якість готових раціонів для відгодівлі свиней різного віку. – Кваліфікаційна робота на правах рукопису.

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

Зміст анотації. Проведено виявлення спектру токсиноутворювачів (грибів родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*) за температурних умов, наближених до таких у період жнив (23°C та 32°C). У випадку використання бідного на органічні компоненти середовища (агар Чапека) серед виділених грибів переважали представники р.р. *Aspergillus* (53,1%) та *Alternaria* (26,6%). Відсоткове співвідношення грибів р. *Penicillium* було мізерним (1,5%), але було виділено гриби р. *Fusarium* (7,8%). На середовищі із значним вмістом органіки (агар Сабуро) спектр мікроміцетів змінився. Переважали гриби р. *Penicillium* (29%), що перевершило кількість аспергілів (27,4%) та альтернарій (19,4%).
Ключові слова: мікроміцети, плісняві гриби, мікотоксини, свині, пшениця.

SUMMARY

Smurov G. O. Micologic Quality of Prepared Rations for Feeding Swine of Various Age. – Manuscript qualification work.

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

Contents of the abstract. The aim of the conducted research was to identify a range of toxins producers (*Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fusarium* spp.) in the temperature conditions close to harvest period (23°C, 32°C). Research analysis has shown the prevalence of the fungi *Aspergillus* spp. (53.1%), *Alternaria* spp. (26.6%) if the organic-poor medium used. The negligible percentage of the *Penicillium* spp. (1.5%), however genus of the *Fusarium* fungi was isolated (7.8%). The spectrum of micromycetes has changed at the organic-rich medium: 29% the *Penicillium* spp. (was dominated), 27.4% *Aspergillus* spp. and 19.4% *Alternaria* spp.

Keywords: micromycetes, molds, mycotoxins, pigs, wheat.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1 Стан сільського господарства в Україні.....	7
1.2 Поширення проблеми мікотоксикозів та ураження зерна мікотоксинами в Україні та світі.....	8
1.3 Особливості пліснявих грибів – продуцентів мікотоксинів.....	11
Висновки до розділу 1.....	14
РОЗДІЛ 2. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	16
2.1 Характеристика природних умов господарства.....	16
2.2 Матеріали та методи досліджень.....	18
2.2.1 Відбір зразків зерна для проведення дослідження.....	18
2.2.2 Схема та опис експерименту.....	18
2.3 Виявлення рівня контамінації зерен фуражної пшениці токсигенними міцеліальними грибами (синтетичне поживне середовище – агар Чапека).....	22
2.4 Виявлення рівня контамінації зерен фуражної пшениці токсигенними міцеліальними грибами (напівсинтетичне поживне середовище – агар Сабуро).....	27
Висновки до розділу 2.....	30
РОЗДІЛ 3 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	31
Висновки до розділу 3.....	34
ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ.....	35
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	36

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

АС – агар Сабуро

АЧ – агар Чапека

КУО – колонієутворюючі одиниці

FAO - продовольча та сільськогосподарська Організація Об'єднаних Націй

pH – кислотність середовища (концентрація H^+ іонів в розчині).

ВСТУП

Актуальність теми дослідження. Україна – аграрно-індустріальна держава із високим потенціалом міжнародного співробітництва. Зважаючи на це, розвиток свинарства таїть під собою ряд тактичних перспектив, адже свині – це багатоплідні тварини, для яких характерним є швидкий ріст, статеве дозрівання та висока конвертація кормових одиниць в прирости живої маси.

Технологічні схеми вирощування цих тварин передбачають використання готових збалансованих кормових сумішей, які наразі великі господарства виробляють самостійно, постійно контролюючи якість та безпечність складових багатокomпонентних кормових сумішей, в яких значний відсоток складають зернові культури. Зважаючи на широке повсякмісне поширення міцеліальних грибів у ґрунтах всього світу та природну закономірну контамінацію ними зернових культур, контроль і моніторинг поширення мікроміцетів – продуцентів мікотоксинів – є важливим завданням для виробництва. Це дає розуміння, який спектр токсинів необхідно контролювати під час оцінки безпечності компонентів раціонів, а темпи дозрівання мікроміцетів за певних умов дозволяють розрахувати терміни безпечного використання кормових сумішей.

Мета і завдання роботи; Ідентифікація грибів – продуцентів мікотоксинів з родів *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, що контамінують зернові корми в Житомирській області. Аналіз контамінації (можливого токсиноутворення) за статистичними даними та в раціонах ТОВ «Агро-ПЕК».

Предмет та об'єкт дослідження. Предмет дослідження – компоненти раціонів для свиней різного віку, що використовуються в ТОВ «Агро-ПЕК» (Житомирська обл., Черняхівський район). Об'єкт дослідження – кількість та спектр грибів, які за генетичними ознаками можуть синтезувати мікотоксини.

Методи дослідження. Проводили мікологічні дослідження (поверхневим методом виділяли накопичувальні культури з поверхні зерен пшениці; у висівах докладно вивчали культуральні ознаки для віднесення ізоляту до певного роду; виділяли чисті культури перспективних токсиноутворювачів. Мікроскопічні

дослідження (просте фарбування матеріалу чистих культур), статистично обробляли результати кількісних висівів.

Перелік публікацій автора за темою дослідження. 1. Смуров Г., Кривда М. Ветеринарія на варті забезпечення харчової безпеки країни / Матеріали XXIV-ї всеукраїнської науково-практичної конференції магістрів та бакалаврів: «Наукові здобутки студентської молоді у ветеринарії». 2021. Вип. 13, С. 222-224.

2. Solodka, L. O., Kryvda, M. I., Kostenok, S. V., & Smurov, G. O. (2021). Мікробне обсіменіння зерен пшениці, вирощеної в Житомирському Поліссі / Bulletin of Sumy National Agrarian University. The series: Veterinary Medicine. 2021. Vol. 4 No.55. P. 24-30. <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2021.4.4>

3. Смуров Г., Солодка Л., Кривда М. Виявлення токсигенних грибів – контамінантів фуражної пшениці. Тези доповідей. Конф. «Дні студентської науки» (19-20 травня 2022). Факультет громадського розвитку та здоров'я ЛНУВМБ ім. С.З. Гжицького. Львів, 2022. С. 88-91.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані в ході проведення експериментів результати дають змогу визначити пріоритетні напрямки токсикологічного аналізу згідно виявленого спектру міцеліальних грибів. Результати обліку дозрівання грибів пов'язані з часом, в який компоненти корму мають бути використані для приготування кормових сумішей задля безпечної відгодівлі тваринам (свиней різного віку).

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 41 сторінці, містить 4 таблиці, 9 рисунків, 48 посилань на бібліографічні джерела та електронні ресурси.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Стан сільського господарства в Україні

Сільське господарство залежить як від локальних змін (кліматичні умови, міграція трудових ресурсів, поширення шкідників), так і від глобально-світових зрушень [1]. Станом на вересень 2021 р. науковці України відзначали складнощі в процесі залучення міжнародних інвестицій до сільського господарства в Україні [2,3]. Зокрема, Ткаченко С. вказує на невизначені пріоритетні сфери залучення інвестицій, а також на відсутність стратегії щодо внутрішніх та міжнародних інвестицій, як в аграрному секторі загалом, так і в його галузях. Хаба та Горновська зазначають, що в аграрній сфері України є прогалини із залученням та розвитком інноваційних технологій (низька зацікавленість інвесторів), що є наслідком недостатчі державної уваги та фінансування. Навіть за таких умов FAO при ООН називає Україну в переліку лідерів експортування зернових (10% світового експортного потенціалу), зокрема пшениці [4].

Тому, з точки зору українських аналітиків та науковців, державна політика має спрямовуватись на зростання інвестиційної привабливості галузей сільського господарства в Україні [2,5]. Одним з кроків є залучення валютних накопичень, зокрема і населення України, встановлення привабливої ставки за довгостроковими вкладками, забезпечення збереження таємниці вкладів, надання гарантій повернення вкладених коштів. Але військова агресія 2022 р. внесла корективи щодо поступового прогресивного руху сільськогосподарської галузі України. Наразі FAO наводить прогнози про різкий сплеск вартості зернових (продовольча та фуражна пшениця, кукурудза), що пояснюється не лише активними військовими діями, але й блокуванням чорноморського судноплавства [4,6]. Так Trading Economics, що веде свої спостереження від 1977 р., демонструє, що вартість зернових цього року збережеться високою:

Україна втратить 20% озимих через військові дії, війна (через економічний спад) боляче вдарить ще по одному світовому зернотрейдеру – росії [7].

Рослинництво – це базова галузь розвитку решти напрямків сільськогосподарського виробництва, адже тваринництво потребує значних затрат кормів на одиницю приросту [8]. Зернова криза провокує певну кризу і в тваринництві, тому особливо гостро постає питання і фізичного збереження наявного ресурсу, і підтримку його якісних показників.

1.2 Поширення проблеми мікотоксикозів та ураження зерна мікотоксинами в Україні та світі

Проблема поширення продуцентів мікотоксинів та реєстрації мікотоксикозів серед населення світу та популяції сільськогосподарських тварин має тривалу історію. FAO наголошує, що питання мікотоксикозів не є локальною проблемою. Випадки прояву даної патології можливі в будь-якій частині світу, але максимальний їх відсоток припадає на депресивні регіони, в яких часто відбувається порушення умов зберігання зернових запасів [9-11].

Поширення токсигенних мікроміцетів має прямо пропорційну залежність від площ вирощуваних злаків. Спори мікроміцетів, не зважаючи на фунгіцидні обробки, поширені в ґрунті, на обладнанні, задіяному в зборі та транспортуванні зерна, в приміщеннях та резервуарах, що використовуються для його зберігання [10]. Різноманітність фунгіального пейзажу залежать від кліматичних умов природних зон (вологості, температури, рівня інсоляції, діапазону кислотності ґрунтів). Умови кліматичних зон безпосередньо впливають на формування ґрунтів, на їх біорізноманіття, в тому числі і щодо мікроскопічних грибів. Чим південнішим є регіон (сірі лісові ґрунти, каштанові, чорноземи), тим кількість спор по відношенню до міцелію збільшується [12]. Тож, при сприятливих умовах (відповідний температурний діапазон, підвищення вологості у дощові періоди) або при зараженні зерна шкідниками в період зберігання, виникають прецеденти інтенсивного розвитку грибів і

накопичення небезпечних речовин. Такий алгоритм є справедливим для великих і дрібних партій зернових. Тому в кожному сільськогосподарському регіоні актуальним є визначення відсотку контамінації зерна мікроміцетами, встановлення тригерних факторів накопичення окремих груп токсинів [10].

Українські дослідники наводять дані, що зерно в різних регіонах України часто контаміновані представниками родів *Fusarium* (26%), *Aspergillus* (21,5%), *Penicillium* (18%), *Alternaria* (12 %), тощо [13,14]. Слід зазначити, що у південних широтах (на чорноземах та червоних ґрунтах) створюються умови для росту вегетативного міцелію. Завдяки високій напруженості біологічних процесів у ґрунті доступний субстрат у цих зонах швидко вичерпується, що призводить до масового утворення спор, запас яких може бути мобілізований при надходженні порцій біологічної речовини [11].

Але видове різноманіття мікроскопічних грибів багатше у північніших регіонах., що є наслідком особливих взаємовідносин між грибом-колоністом та рослиною-господарем. У цьому випадку також велике значення мають гідротермічні умови (вологість, температура повітря), кількість та характер внесених у ґрунт добрив, резистентність конкретного сорту рослин [15]. Так за наявними літературними даними, відносна вологість повітря в межах 70-100% сприяє поширенню грибів роду *Fusarium spp.* Епіфітотепія фузаріозу колосу спостерігається при підвищеній вологості та температурі повітря 28-30°C [16], хоча гриби можуть розвиватися за температури 3-4°C [16,17].

Кислі ґрунти (рН 4,0-5,0) виявляються багатшими на грибний міцелій, ніж нейтральні та лужні (рН 6,0-7,5), особливо за наявності великої кількості органічних речовин (торф'яники). У випадку штучного залуження ґрунтів чисельність та видовий склад мікроскопічних грибів в них змінюється незначно, хоча відмічається збільшення частки нижчих грибів родин *Dematiaceae*, а також наступних представників *Monilia geophila*, *Penicillium nigricans*, *Penicillium Simplicissimum* та *Rhizopus nigricans*. На бідних вологою та засолених ґрунтах (вміст солі 10-20%) здатні активно розвиватись гриби роду *Aspergillus* [17,18].

Серед великої різноманітності мікроскопічних грибів особливої уваги заслуговують представники родів *Aspergillus* та *Fusarium*. Саме гриби роду *Fusarium* в останні 50 років вважають найбільш небезпечними токсиноутворювачами, що контамінують як продовольче, так і фуражне зерно [19,20]. Вони продукують такі небезпечні мікотоксини, як афлотоксини, зеараленон, Т-2 та НТ-2 токсини, енніатини та боверицин, моніліформін, а також – циклопіазонову кислоту та В-трихоноцени, до яких належать діоксиніваленол, 3-ацетил-деоксіваленол, 15-ацетил-деоксиніваленол та ніваленол [20-22]. Для певних видів зернових культур навіть встановлено спектр характерних токсинів (табл.1).

Таблиця 1 Спектр мікотоксинів, зареєстрованих в зернових та бобових [23].

Назва токсину	Культири, що вражаються окремим видом мікотоксину
Афлатоксини	арахіс, кукурудза, пшениця, насіння бавовни, горіхи
Охратоксин	пшениця, ячмінь, овес, соя, суха квасоля
Фумонозин	кукурудза, пшениця, сорго, ячмінь, овес
Зеараленон	кукурудза, кукурудза, пшениця, ячмінь, жито
Дезоксиніваленол	кукурудза, пшениця, ячмінь, овес
Цитринин	пшениця, ячмінь, кукурудза, рис

Мікотоксини є простими білками, низькомолекулярними вторинними метаболітами, які володіють гормоноподібною, гепатотоксичною, імуносупресивною, канцерогенною, мутагенною та нефротоксичною дією [17,19]. Їх особлива підступність полягає у термостабільності структури та кумулятивному ефекті в організмі тварин. За мінімальних концентрацій їх дія проявляється у вигляді не гострого, а хронічного отруєння, а самі вони накопичуються у тканинах тварин. Тобто їх дія не припиняється на векторі «зерно-споживач», ланцюг їх поширення може бути довшим: «зерно-тварина-людина». До того ж в мікрокількостях мікотоксини спричиняють «непомітні», але значущі економічні втрати для кожного окремого господарства: недоотримання приростів маси тіла молодняка на відгодівлі, аборти на ранніх термінах, народження нежиттєздатного молодняка,

імуносупресії, підвищення витрат на терапевтичні та профілактичні заходи [19,21,24,25].

За рекомендаціями FAO [10] стримування поширення мікотоксикозів в світі може лише планомірний, постійний та послідовний контроль контамінації зернових після збору врожаїв та в період тривалого його зберігання (небезпека накопичення мікотоксинів в партіях зерна зростає пропорційно термінам збереження).

1.3 Особливості пліснявих грибів – продуцентів мікотоксинів

Мікроскопічні (плісняві) гриби є це нижчими еукаріотами. Регуляція їх морфогенезу, на відміну від вищих тварини і рослин, відбувається не через зміну гормонального статусу організму, а за рахунок сигналів із зовнішнього середовища. Наприклад, вміст CO₂ пригнічує активність цілого ряду ферментів і впливає на характер розмноження: статевого (продукування активних зооспор) чи нестатевого (утворення спорангію та спор спокою).

При проростанні спори у росткову трубку (найчастіше їх утворюється 2-3) формується вегетативне тіло грибів – міцелій, що має апікальний ріст та бокове гілчасті відгалуження. Галуження відбувається не спонтанно, а за наявності критичної маси цитоплазми у гіфі. Включення нових речовин до мітотичної клітини відбувається лише в апікальній ділянці, тут проходять найактивніші синтетичні процеси. Загалом, грибні колонії мають радіальний ріст (розростаються від центру) та, як наслідок, сферичну форму. Гіфи міцелію у різних видів або позбавлені перетинок, або розділені септами. Кожна відділена клітина може містити від одного до кількох ядер, що є наслідком невідповідності синтезу ядер та перетинок: спочатку в клітині утворюється ядро, а потім – формуються септи [17].

Наявність вологи суттєво впливає на морфогенез грибів, ступінь розгалуження, інтенсивність споруляції та репродукцію. Для росту міцелію, формування репродуктивних органів потрібна більша кількість води, ніж для проростання спор. Цікаво, що потреба мікроскопічних грибів у воді нижча, ніж

у бактеріальних клітин. Особливою стійкістю відрізняються *Alternaria alternata*, *Ulocladium botriosium*, *Penicillium funiculosum*.

Температурні фактори часто є визначними для поширення грибів, хоча серед даної морфологічної групи зустрічаються як психрофіли ($t=0^{\circ}\text{C}$), так і термофіли ($t=+55^{\circ}\text{C}$). Більшість аспергилів зростають в діапазоні вищих температур, тому у північних широтах переважають пеніцили. Вони зустрічаються й у південних регіонах, хоча займають значно меншу долю серед інших грибів [18]. Це означає, що температурний фактор може значно змінювати видову різноманітність мікроміцетів в ґрунті і на зернових кормах.

За характером росту вегетативне тіло мікроскопічного гриба поділяють на субстратний (стелиться безпосередньо поверхнею субстрату) та повітряний міцелій (має лише кілька точок з'єднання з середовищем). Ці типи міцелію різняться і біохімічною активністю, і будовою. Так, повітряний міцелій містить в цитоплазмі менше вакуолей та включень жиру. Субстратні ж гіфи можуть мати модифікації, як сильно розгалужені ризоїди у *Rhizopus spp.* [17].

У одноклітинних грибів ендогенні спори утворюються всередині спорангіїв, у багатоклітинних, екзогенні спори (конідії) – на конідієносцях (рис.1).

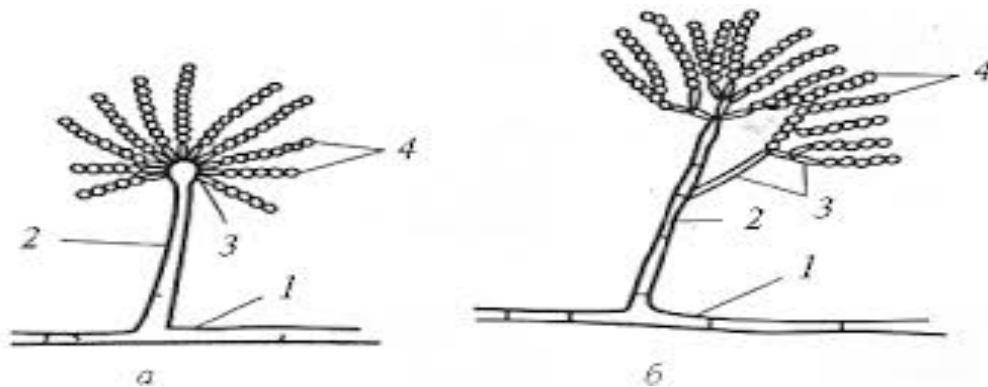


Рис. 1 Структура конідієносців у грибів р.р. *Aspergillus* (а) і *Penicillium* (б) :

1 — вегетативний міцелій; 2 — конідіофор; 3 — стеригми;

4 — конідії із спорами.

Останні є різноманітними за будовою, розміщуються над міцелієм поодинокі, групами або суцільним шаром. Конідій також мають характерне

розміщення: поодинокі, групами або ланцюжками [23, 26]. У деяких грибів на вершині конідієносців розміщуються специфічні утворення – стеригми (зазвичай мають форму пляшок), а вже до них прикріплюються конідії.

Розвиток міцелію на поверхні, як зернових, так і грубих кормів, супроводжується зміною їх органолептичної якості та поживної цінності, що може значно впливати на продуктивність тварин, яким згодовується відповідний корм. Тому органолептична оцінка корму – це перший етап мікологічної експертизи у випадку підозри на розвиток мікотоксикозу у тварин [27,28]. Під час проведення такого аналізу корму звертають увагу на забарвлення, запах, вигляд ендосперму і зародка у досліджуваних зерен. Розвиток міцелію грибів на грубих кормах спричинює потемніння і побуріння стебел, супроводжується утворенням на них грибного нальоту, що відрізняється за кольором (чорний, червоний, білий, різної інтенсивності зеленого, сіруватий, тощо) [29].

За умови розвитку на зернових кормах грибів родів *Aspergillus*, *Penicillium* тощо зародок зерна темніє (чорніє), а поява пліснявого нальоту на поверхні зерен (зелених, сірих, голубуватих відтінків) супроводжується затхлим запахом [29,30]. У випадку зараження корму грибами р.*Fusarium*, зерна стають зморщеними, втрачають склоподібність та блиск, мають біле, іноді з малиновим відтінком забарвлення, що відповідає одному із 4-х ступенів ураженості зерен:

- перший ступінь** – зерно має солодовий запах; колір зовнішніх покривів без змін; ендосперм з нормальним відтінком;
- другий ступінь** – зерно з цвілево-затхлим запахом; зовнішній покрив зерен без блиску, ендосперм і зародок, при ураженні їх мікроорганізмами, можуть бути темними;
- третій ступінь** – зерно має цвілево-гнильний запах; колір зовнішніх покривів зерна темний; ендосперм кремовий, уражений зародок;
- четвертий ступінь** - зерно з гнильним запахом, ендосперм коричневого кольору.

Але часто органолептично задовільні корми стають джерелом отруєння тварин, адже розвиток мікроміцелію може проходити без видимих змін на перших етапах, а продукування мікотоксинів є відповіддю на різкі стресові зміни зовнішніх умов (коливання температури «холод-тепло») [23]. Так, афлотоксини-гепатотоксиканти (спричиняють гепатокарциному) об'єднують в собі щонайменше 16 близькоспоріднених речовин і продукуються, переважно, грибами роду *Aspergillus* [23,31,32] у теплих та спекотних умовах ($t=25-37^{\circ}\text{C}$).

Охратоксини (охратоксин А та охратоксин В) є метаболітами ряду грибів – *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* та *Aspergillus carbonarius*. Ці види здатні рости у широкому діапазоні (від 8 до 37°C), але охратоксини продукують за температури $25-30^{\circ}\text{C}$. Для продукування цитрину (гриби родів *Aspergillus* та *Penicillium*) також необхідна температура $20-30^{\circ}\text{C}$.

Фуmozини заслуговують особливої уваги як канцерогенні речовини. Тропічні та субтропічні кліматичні умови оптимальні для росту основних продуцентів фуmozинів – *Fusarium liseola*, *F. verticillioides* та *F. proliferatum*. Оптимум для синтезу цієї групи токсичних речовин лежить в діапазоні $15-30^{\circ}\text{C}$. Зеараленон та деоксиліваленон також виділяють гриби роду *Fusarium* (*F.graminearum*, *F. culmorum*, *F.crookwellense*, *F.equiseti* та *F.semitectum*) і ці токсини реєструються у всіх основних зернових культурах. Оптимум для їх продукування – це літні температури України ($25-30^{\circ}\text{C}$), до того ж це відбувається за мінімальних показників вологості (16%).

Зважаючи на наведені дані, зрозуміло, що для профілактики мікотоксикозів критично важливим є збереження запасів зернових за постійно низької температури та мінімальної вологості.

Висновки до розділу1

Україна за рахунок власного аграрного потенціалу має значний відсоток сільськогосподарського імпорту. Особливе місце в рейтингу українського експорту займає експорт зерна та сонячної олії. Основною умовою у виконанні взятих на себе національних та міжнародних зобов'язань є забезпечення не

лише якісного, але й безпечного сільськогосподарського продукту. Збереження високої якості рослинницької продукції після збору, по-перше, робить її цінною продовольчою сировиною та безпечним продуктом, якого потребують різні країни планети. По-друге, безпечне за мікологічними показниками зерно є хорошою кормовою базою для багатьох галузей тваринництва, зокрема – свинарства.

Мікроміцети – невід’ємна складова всіх типів ґрунтів, незалежно від їх родючості, специфіки хімічного складу чи вологості. Кліматичні умови певного року чи сезону, штучні зміни хімічного та біологічного складу ґрунтів впливають не на наявність, а лише на видове різноманіття мікроміцетів.

Ключовою особливістю пліснявих грибів є здатність до виділення особливих білкових молекул, які небезпечні для хребетних тварин через спричинення токсичного впливу: гострі отруєння, хронічні мікотоксикози (за надходження в організм мікродоз токсинів, що мають кумулятивний ефект). Профілактика розвитку зазначених хвороб полягає, в першу чергу, в створенні в місці зберігання стабільних, позбавлених стресових температурних коливань умов з постійною зниженою вологістю (попередження активного розвитку міцелію та виділення мікотоксинів).

Постійний мікологічний моніторинг дозволяє визначити більш та менш небезпечні партії зерна, визначає черговість їх використання. Певна оптимізація стандартної методики виявлення мікроміцетів, наступний аналіз зв’язків між групами факторів та інтенсивністю зростання грибів на лабораторних субстратах дозволить ефективно організовувати роботу практичних спеціалістів на кормозаготівельних виробництвах чи в приватних господарствах, де готові суміші для згодовування тваринам виробляють із власних запасів монокормів.

РОЗДІЛ 2. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Характеристика природних умов господарства

Дослідження проведено в господарстві замкненого циклу ТОВ «Агро-ПЕК», сільрада Пекарщинська, 12330, Черняхівський р-н, Житомирська обл. Одним з технологічних напрямків дослідного господарства є вирощування свиней, а саме - дорощування тварин (свиней) та виробництва м'яса. Слід зазначити, що господарство відноситься до підприємств закритого типу виробництва, має свої посівні площі для забезпечення власними кормовими культурами як компонентами раціонів.

Господарство розміщене в кліматично-географічній зоні Житомирського Полісся. В геоструктурному відношенні воно розміщене в межах Українського кристалічного щита (північно-західна його частина), що є складовою Руської платформи.

Клімат даного регіону характеризується як помірно-континентальний: тепле вологе літо, м'яка хмарна зима, протягом якої періоди похолодання чергуються із стрімкими відлигами, що спричиняє нестійкий сніговий покрив в регіоні. Найхолоднішим місяцем вважається січень (середня температура -8°C), хоча максимально низькі температури сягають -30°C . Найтеплішим місяцем є липень із середнім температурним діапазоном $+17-19^{\circ}\text{C}$. Вегетаційний період в даному регіоні починається в середині квітня і триває до третьої декади жовтня (час із середньодобовою температурою понад $+5^{\circ}\text{C}$), а період з температурним діапазоном понад 0°C триває 240-260 діб [33].

Тож регіон характеризується середніми температурами протягом року, достатньою вологістю для ведення сільського господарства, вільною циркуляцією повітряних мас різного походження внаслідок переважання рівнинної місцевості. Це підтверджується аналізом середньодобових температур в період збору пшениці (на території Житомирського Полісся цей період триває з середини липня до початку серпня).

Так з 15.07 по 6.08 (час жнив 2020 р.) 5 днів (21,7% періоду) денна температура повітря в Житомирській області складала $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$ (відповідно до даних сайту веб-сайту World-weather). Натомість 12 діб (понад 50% часу жнив) середня температура коливалась в діапазоні $(24\pm 2)^{\circ}\text{C}$ (табл. 1).

В той самий час, нічні температури були, переважно, в діапазоні $(15\pm 2)^{\circ}\text{C}$ - 16 з 23 діб (майже 70%). Тож коливання денних та нічних температур складав від 4 до 14°C , хоча у 82,6% діапазон коливань складав $7-12^{\circ}\text{C}$ [34].

Таблиця 2 Температурні коливання на території Житомирського Полісся в період збору досліджуваних кормів [34].

Температурний діапазон, $^{\circ}\text{C}$	Кількість днів протягом жнив	Співвідношення до всього часу жнив, %
Період жнив, 2020 р.	23	100
ніч (15 ± 2)	16	69,6
день (24 ± 2)	12	52,2
день (30 ± 2)	5	21,7

Зважаючи на невисокі середньодобові температури, високу вологість та залісненість та заболоченість території на просторах Житомирської області переважають дерново-підзолисті типові та оглеєні ґрунти, що і мають перевагу на території ведення господарської діяльності дослідного господарства [33].

Отже регіон діяльності господарства ТОВ «Агро-ПЕК» характеризується порівняно м'якими, характерними для регіону Житомирського Полісся, кліматичними умовами із частими коливаннями морозів та відлиг в зимовий період, що спричиняє постійне коливання вологості, а це є важливо (необхідною) умовою для проростання спор та розвитку міцелію [30]. Вологість повітря в регіоні є достатньою для ведення сільськогосподарської діяльності, зокрема для вирощування зернових кормів, але регіон характеризується помірними врожайми через небагаті за своїм органічним складом окислені ґрунти [33,35].

Тож метою нашого дослідження стало з'ясування мікологічної забрудненості зерна фуражної пшениці, зібраної влітку 2020 року на території

Житомирського Полісся та використовуваної як компонент кормових раціонів тварин (свиней) за рік (в 2021 році), а також – з’ясування особливостей росту мікроскопічних грибів – контамінантів фуражного зерна - *in vitro*.

2.2 Матеріали і методи дослідження

2.2.1 Відбір зразків зерна для проведення дослідження. Для забезпечення чистоти експерименту та достовірності отриманих результатів нами була відібрана середня проба зразка корму (фуражного зерна пшениці). Для цього стерильним металевим совком зерно (масою близько 1 кг) відбирали з верхнього, середнього та нижнього шарів насипу, а середню пробу переносили у стерильний паперовий пакет, що цілком відповідає вимогам до тари, в яку здійснюється відбір середньої проби під час дослідження зразків на наявність збудників мікотоксикозів у зразку харчового продукту: «лабораторний зразок поміщають у чистий інертний контейнер, який забезпечує належний захист від забруднення (контамінації), впливу на склад зразка та пошкодження під час транспортування.» [36].

Під час відбору середнього зразку керувались наступною формулою (1) для визначення частоти відбору зерна із партії (маса визначається в кг):

$$\text{частота відбору (SF) } n = \frac{\text{маса партії} \times \text{маса точкового зразка}}{\text{маса об'єднаного зразка} \times \text{маса роздрібної (індивідуальної) упаковки}} \quad (1)$$

Під час обрахунку десяткові цифри, відповідно до настанов, округлювали до найближчого цілого значення [36].

2.2.2 Схема та опис експерименту. Після відбору зразку корму в господарстві упакований пакет переміщали до лабораторії Поліського національного університету (м. Житомир), де проводили аналіз контамінації зерен мікроміцетами.

Розлив поживних середовищ, всі висіви та пересіви, докладний опис культуральних ознак в накопичувальних культурах та культурах окремих ізолятів, вивченням біологічних особливостей досліджуваних культур, мікроскопічні дослідження проводили в асептичних умовах в стаціонарному боксі (біля полум'я пальника). Перед роботою приміщення боксу дезінфікували та обробляли ультрафіолетовим опроміненням бактерицидними лампами впродовж 30 хв. [37].

Відповідно до загальноприйнятих правил роботи в мікробіологічній лабораторії посуд, середовища та інструменти, що використовувались, піддавались стерилізації. Стерилізацію чашок Петрі, стаканів, скляних паличок, пакетів для відбору середньої проби, фольги тощо проводили методом сухого жару, у сушильній шафі за температури 175°C впродовж 1 години. Стерилізацію інструментарію (мікробіологічні голки, мікробіологічні петлі чи гачки, пінцети) проводили безпосередньо перед роботою, методом фламбування, за використання полум'я пальника. Використані поживні середовища готували згідно інструкції: відважували певну кількість порошку, розчиняли у воді, кип'ятили та автоклавували за температури 121°C 15-30 хв.

Для виявлення мікологічних контамінантів зерна використовували два твердих за консистенцією живильних середовища: агар Чапека та агар Сабуро з антибіотиками (табл. 3). Агар Чапека, для пріоритетного виділення аспергилів та фузаріїв, повинен мати кислотність на рівні 6,0-6,5. Саме в такому діапазоні зазначені гриби активно зростають. Тому середовище готували не на дистильованій воді, як агар Сабуро, а на більш кислій водопровідній. Наявність в даному середовищі 3% сахарози та такої нестандартної неорганічної солі як нітрит натрію, робить його спеціальним за призначенням. Через додавання антибіотику агар Сабуро за призначенням також належить до спеціальних, а зазначений компонент не дозволяє розвиватись колоніям бактерій на поверхні агарової пластинки.

Висів на середовища здійснювали з частини підготовленої проби, розміщуючи зерна (по 5 шт., в 10-ти повторях) у чашці Петрі так, щоб створити

вільний простір для росту вегетативних клітин (гіфів) мікроміцетів навколо зерен. Інкубацію чашок проводили в термостаті за температур, що відповідали середнім літнім – 32°C та 23°C.

Таблиця 3 Склад поживних середовищ для виявлення грибів

Назва середовища	Тип середовища	Склад поживного середовища (на 1 л води)	Діапазон кислотності (од. рН)
Агар Чапека	Синтетичне, спеціальне	Сахароза – 30 г NaNO ₃ – 2 г K ₂ HPO ₄ – 1 г MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,5 г KCl – 0,5 г FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,01 г Агар-агар – 20 г	5,8-6,5
Агар Сабуро з антибіотиками	Напівсинтетичне, спеціальне	Декстроза – 30 г Пептон – 10 г Агар-агар – 15 г	5,4-5,8

Для підготовки наважки зерна середню пробу (вміст пакету) переносили в боксі на стерильну фольгу, у формі прямокутника, після чого з використанням стерильних паперових стаканчиків методом квадрату формували наважку для дослідження. Вміст стаканчиків перемішували у скляному стакані скляною паличкою, формуючи загальну пробу масою 350 г. Дослідження виконували за наступною схемою (рис. 2)

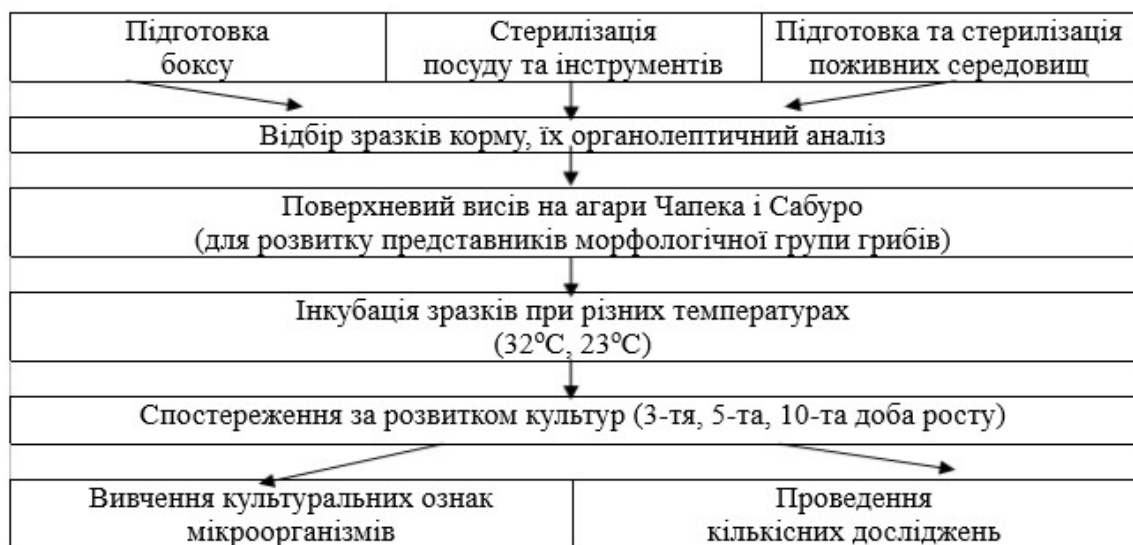


Рис. 2 Схема підготовки і проведення мікологічного дослідження

Облік результатів проводили з 3-ї до 10-ї доби. Кожен раз чашки Петрі діставали із термостату та переносили до приміщення стаціонарного лабораторного боксу. Під час реєстрації результатів звертали увагу на частку контамінації зерен (зерна, навколо яких спостерігався ріст), кількісні показники контамінації зерна (кількість колоній на чашці Петрі), якісний склад контамінантів (видове співвідношення мікроорганізмів – мікроміцетів з поверхні зерна).

Макроскопічний аналіз висівів передбачав вивчення характерних для представників морфологічної підгрупи та специфічних для певного виду культуральних ознак з наступним обліком результатів. Під час аналізу звертали увагу на колір, вигляд центру, периферії та поверхні колоній грибів, інтенсивність росту мікроміцету, ступінь розвитку повітряного міцелію, оптичні властивості, особливості структури поверхні та зворотної сторони (реверсу) колонії, наявність чи відсутність склероціїв, пігменту, крапель метаболітів [37].

Мікроскопічне дослідження проводили після приготування фіксованого препарату (дотримуючись правил асептики, при полум'ї пальника). Для цього маленькі частинки міцелію, бажано із спороношенням, відібрані мікологічним гачком, як із молодих (з країв), так і більш старих (у центрі) частин колоній, помішали на предметне скло у краплю дистильованої води [37,38]. Для поліпшення видимості контурів конідій, гіфів та репродуктивних структур використовували просте фарбування з використанням барвників синього та фіолетового ряду (генціан-фіолетовий). За допомогою малого (x8, x10), а потім більшого об'єктивів (x40, рідше x90) вивчали препарати, робили їх знімки.

Надалі, використовуючи мікологічні ключі та атласи, проводили родову, а інколи – і видову ідентифікацію грибів, опираючись на культуральні особливості колоній, форму та забарвленість спор, кількість та наявність перетинок в гіфах, розгалуження гіфів, розміщення та форму конідій та конідійноносців, а також - стеригм [38-40].

2.3 Виявлення рівня контамінації зерен фуражної пшениці токсигенними міцеліальними грибами (синтетичне поживне середовище – агар Чапека)

Токсигенні міцеліальні гриби вирощували на синтетичному середовищі (агар Чапека) за температури 23°C (дослід №1) та 32°C (дослід №2). Наведені температури інкубації були максимально наближені до природних умов періоду збору врожаю пшениці в 2020 році. Колонії потенційно токсигенних мікроміцетів виявляли на 3-ту, 5-у, 7-у та 10-у добу культивування:

1. Дослід №1 (температура 23°C). На 3-тю добу культивування навколо зерен був помітний ріст білих гіфів, характерний для молодих колоній міцеліальних грибів. Але в цей період неможливо було чітко визначити всі центри росту, провести родову чи видову ідентифікацію внаслідок відсутності певних культуральних ознак. Тому збір результатів щодо обсіменіння зерен розпочинали з 5-ї доби.

Спостереження за посівами дало можливість зафіксувати основні прояви контамінації зерен пшениці в період з 5-ї по 10-ту добу (рис.3).

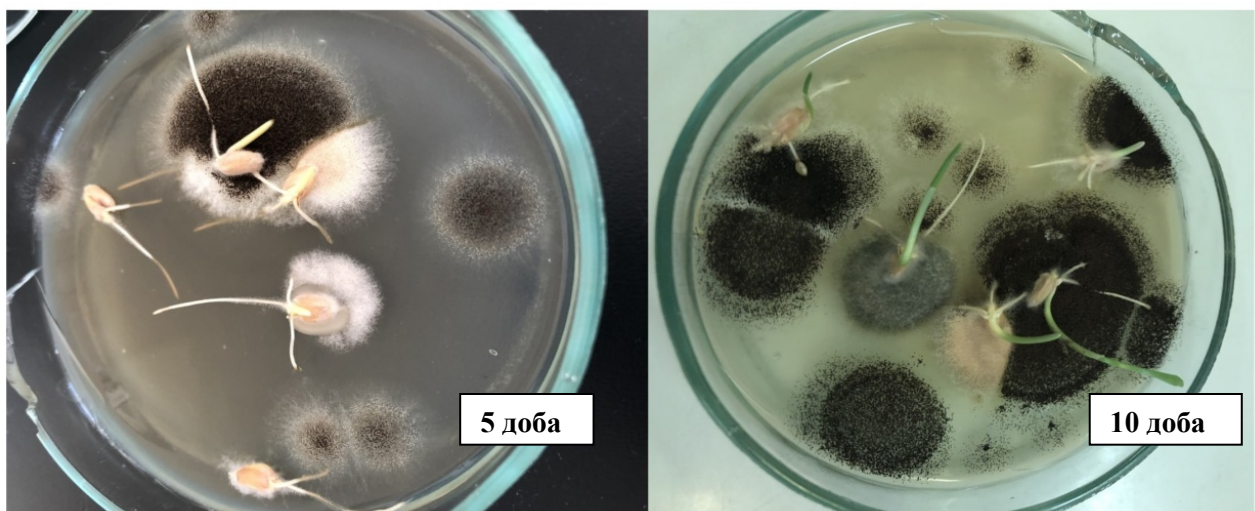


Рис. 3 Зміни ознак грибних колоній на синтетичному середовищі
(агар Чапека, $t=23^{\circ}\text{C}$, 5-та та 10-та доба інкубації)

На 5-ту добу навколо 60-100% зерен розвивався пігментований міцелій, що належав різним видам грибів, але розпочати визначення роду було можливо лише для аспергилів секції *Nigri*. На десяту добу обсіменіння зерен в усіх чашках Петрі сягало практично 100%. Тож, загальна контамінація міцеліальними грибами (залежно від чашки Петрі), на 5-ту добу змінювалась від 86 до 94% , а на десяту – від 93 до 99% (табл.4).

Таблиця 4. Зміна кількості грибних колоній колоній на синтетичному середовищі (агар Чапека, $t=23^{\circ}\text{C}$, 5-та та 10-та доба інкубації)

№ зразку	Ураження зерен зерен, %		КУО в чашці Петрі	
	5 доба	10 доба	5 доба	10 доба
Чашка № 1	80	80	4	5
Чашка № 2	100	100	9	10
Чашка № 3	100	100	7	12
Чашка № 4	60	80	6	7
Чашка № 5	100	100	8	14
Чашка № 6	80	100	5	9
Чашка № 7	100	100	5	5
Чашка № 8	80	100	5	13
Чашка № 9	100	100	6	9
Чашка №10	100	100	7	13
Всього	$90\pm4,5$	$96\pm2,7$	$(6,2 \pm 0,5)$ шт.	$(9,7 \pm 1)$ шт.

З 5-ї доби культивування грибні газони ставали щільнішими, а поверхня колоній, зокрема аспергилів, активно вкрилась пігментованими спорами. За температури 23°C на 10-ту добу було ідентифіковано близько 80% колоній грибів, що вирости за цей час.

2. Дослід №2 (температура 32°C). Нами було помічено залежність прояву культуральних ознак від температури культивування. Якщо у випадку інкубації зерен за 23°C виражені репродуктивні структури при наявності мінімального розміру білих країв спостерігалась на 5-у добу у шостої частини описаних колоній, то за температури 32°C такі культуральні ознаки реєстрували у всіх колоній. Набір ознак (колір, дрібно- чи крупнозернистість або волокнистість поверхні) дозволяли віднести мікроби колоній до представників певного роду, а інколи – навіть виду. Так, на чашках Петрі, показаних на рис. 4, представлені:

- значна кількість колоній аспергилів секції *Nigri* (чорні колонії з дрібнозернистою поверхнею);
- по одній колонії грибів видів *Asp. flavus* (жовто-зелена, з крупнозернистою поверхнею та волокнистим підвищенням центром) і *Asp. fumigatus* (сіро-зелена пласка з дрібнозернистою поверхнею).



Рис. 4 Ріст аспергилів навколо зерен пшениці на синтетичному середовищі (агар Чапека, $t=32^{\circ}\text{C}$).

Починаючи з 5-ї доби кількість зареєстрованих колоній, їх якісні показники (розмір, інтенсивність пігментації тощо) майже не змінювались. Це означає, що для більшості ізолятів потенційних токсиноутворювачів, наявних на зернах пшениці (аспергили), температура в 32°C прискорює темпи росту приблизно в 2 рази. За температури 32°C , на 5-ту добу, із всіх колоній грибів, що вирости в чашках Петрі, вдалось ідентифікувати 43 шт. або 66%. Справа в тому, що майже в усіх чашках Петрі, у випадку культивування при 32°C , росли не лише міцеліальні гриби, але й певна кількість мікробів з інших морфологічних підгруп.

Мікроскопічне дослідження матеріалу з колоній потенційних продуцентів мікотоксинів дозволило стверджувати, що найчастіше доводилось ідентифікувати представників родів *Aspergillus* та *Alternaria* (рис.5). Колоній токсиноутворювачів з роду *Aspergillus* на синтетичному поживному середовищі виростало близько 53%, а з роду *Alternaria* – 27% від загальної кількості всіх грибних колоній, отриманих при двох зазначених температурах в 20-ти чашках Петрі. В усіх чашках з агаром Чапека, при зазначених температурах, також росли гриби роду *Penicillium* (1,5%) та фітомікроміцети родів *Mucor* та *Rhizopus* (11%).

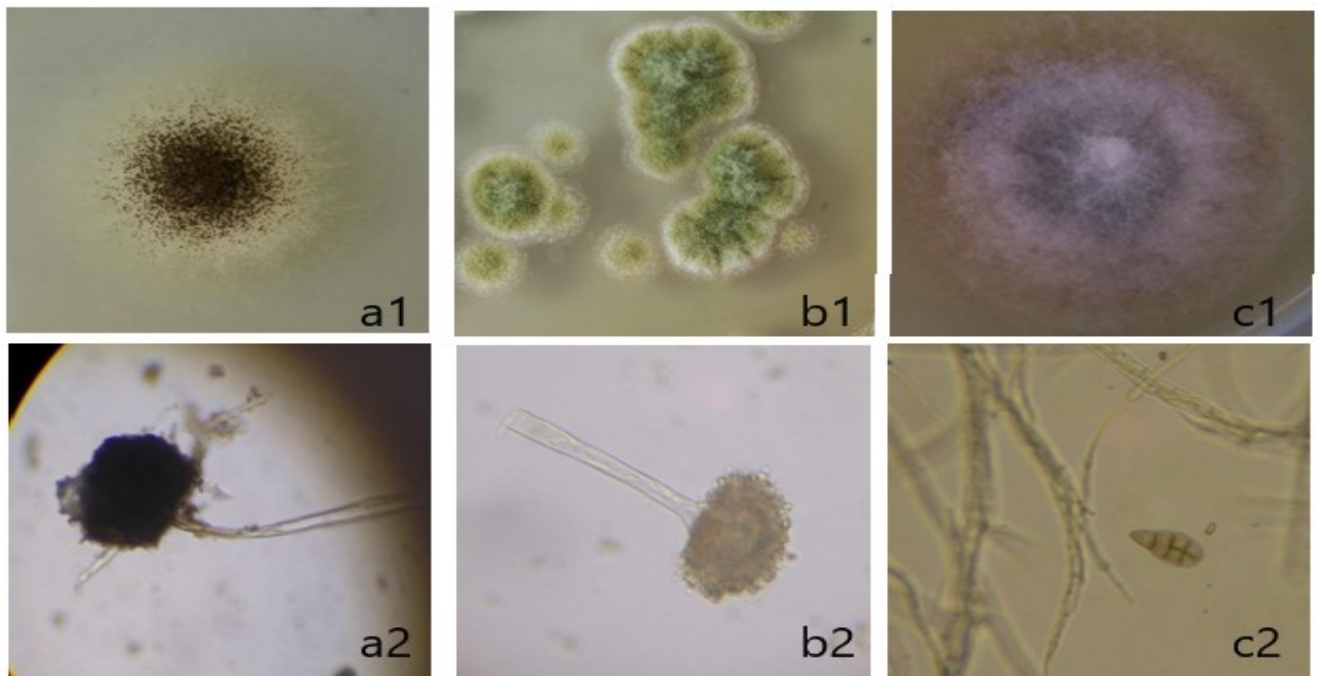


Рис. 5 Потенційні токсиноутворювачі на зернах пшениці (агар Чапека):

a1-b1 – гриби роду *Aspergillus* ; c1 – гриби роду *Alternaria*;

a2-b2 – мікроскопія, що підтверджує належність грибів до роду *Aspergillus* (характерні пігментовані спори, розміщені на конідієносцях);

c1 – мікроскопія, що підтверджує належність грибів роду *Alternaria* (характері конідії та сегментовані тонкі гіфи).

Окремої уваги заслуговують гриби роду *Fusarium*, які були виявлені в окремих чашках із синтетичним поживним середовищем після 10-ї доби росту,

при збереженні посівів в приміщенні мікробіологічного боксу за низьких температур (рис. 6).

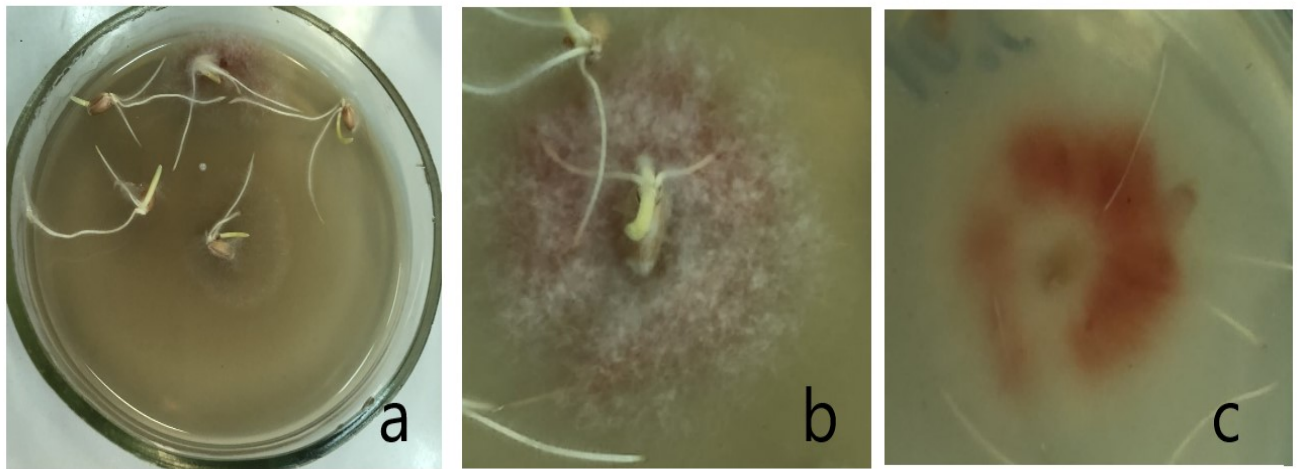


Рис. 6. Колонії грибів роду *Fusarium* на агарі Чапека:

- а – субстратний та повітряний міцелій навколо зерен;
- б – колонія навколо зерна з чіткими культуральними ознаками;
- с – зворотній бік колонії з характерною культуральною ознакою (виділення пігмента)

Мікроскопія колоній з червоною пігментацією на реверсумі (зворотній бік), підтвердила приналежність мікроорганізмів до роду *Fusarium* (рис. 7).

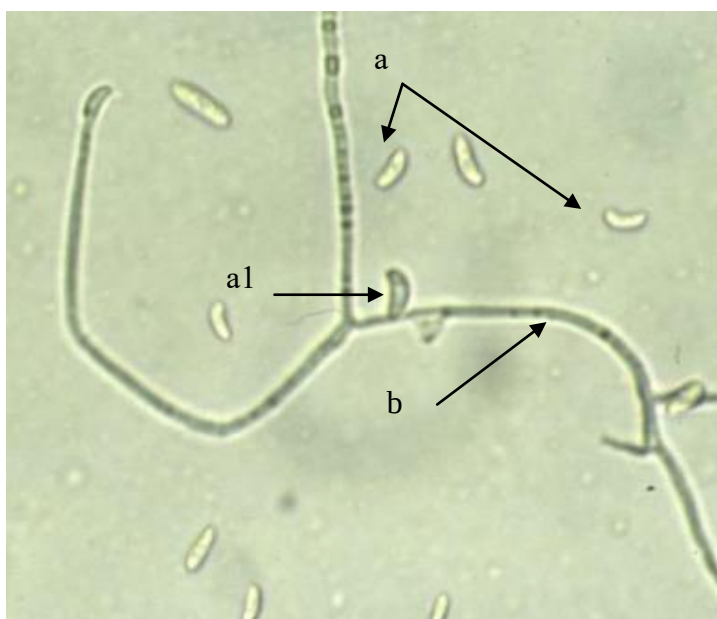


Рис. 7 Специфічні конідії, характерні для грибів роду *Fusarium*:

- а – характерні вигнуті конідії;
- а1 – конідії, прикріплені на гіфі;
- б – сегментовані гіфи.

Серед всіх колоній мікроміцетів їх було всього 8%, але виявлення цих грибів свідчить про наявну небезпеку розвитку мікотоксикозів у тварин [41]. Гриби цього роду здатні продукувати не лише високотоксичні фумозини, але й моніліформін, зеараленон, деоксиліваленол та два типи трихотиценів (тип А та тип В), що значно підвищує ступінь ураження організму тварини, яка споживає раціони на основі даної фуражної пшениці.

2.4 Виявлення рівня контамінації зерен фуражної пшениці токсигенними міцеліальними грибами (напівсинтетичне поживне середовище – агар Сабура)

Агар Сабура (АС), як і агар Чапека (АЧ) вважають середовищем, яке чудово підтримує ріст міцеліальних грибів та дріжджів. Воно має більш різноманітний, порівнюючи з АЧ, набір органічних речовин (за рахунок пептону ферментативного). Зазначений компонент АС містить значну кількість коротких пептидів, які утворюються в м'ясних переварах. Окрім того, в пептоні наявні ліпіди, іони металів, різноманітні солі, вітаміни. Декстроза з агару Сабура також дуже важлива для життєдіяльності представників морфологічної групи «Гриби». В ході обміну речовин вони перетворюють декстразу на аскорбінову кислоту, підкислюючи середовище існування, чим сприяють прискореному росту гіф, спороутворенню та інтенсивності спороношення.

Виявивши, що на АЧ, разом з грибами, ростуть колонії з морфологічної групи бактерій, ми вибрали варіант агару Сабура з антибіотиками, які мають перешкоджати розвитку бактерій. Методичні підходи до роботи із зернами фуражної пшениці на агарі Сабура не відрізнялись від таких на агарі Чапека (дослід №3 – 23 °C, дослід №4 – 32 °C).

В досліді №3 та №4 використання амінокислот, олігопептидів та вуглеводів пептону, певні зміни рН поживного середовища за рахунок утилізації декстрази дозволили мікроміцетам певних родів рости більш стрімко. Вже на 5-у добу (23 °C) та на 3-4-ту добу (32 °C) колонії грибів росли навколо 100% зерен, характеризувались чіткими культуральними ознаками

(мали виражені центр, периферію та край, більш розвинений повітряний міцелій), що дозволяло відокремити потенційних токсиноутворювачів (рис. 8).

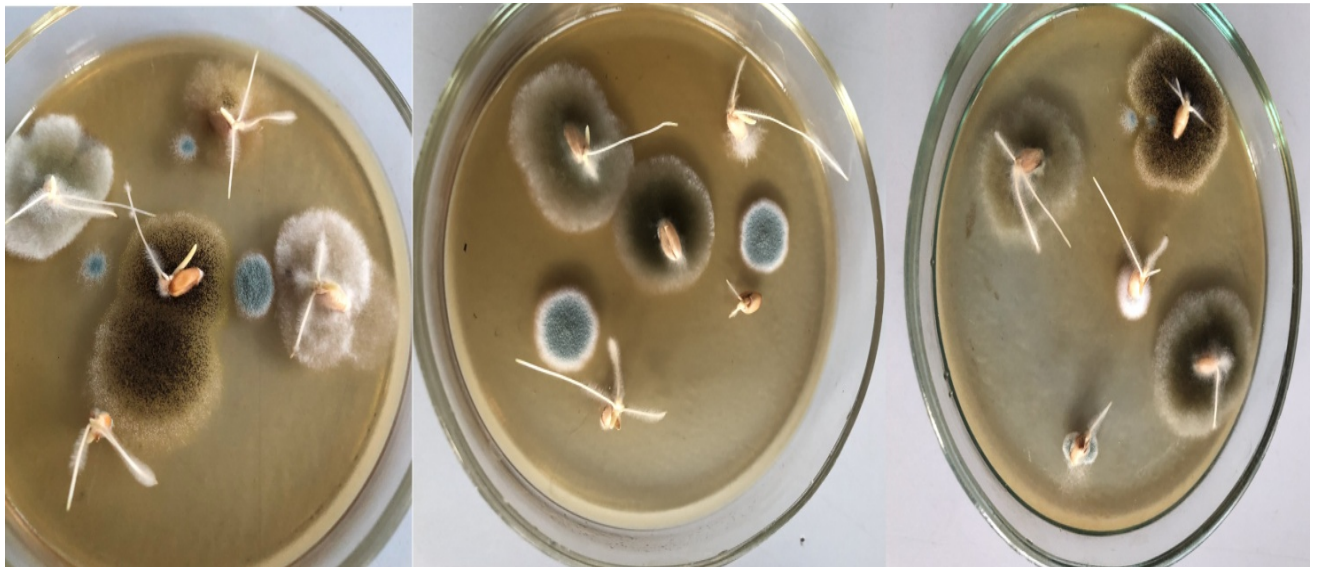


Рис.8. Ріст колоній міцеліальних грибів на агарі Сабуро
(дослід №3, 23°C, 5 днів інкубації).

Надалі накопичувальні культури в чашках Петрі старіли. Це проявлялось у концентричному рості навколо первинних колоній, вторинному рості в центрі колоній, рознесенні конідій на вільну поверхню поживного середовища, збільшенні кількості злитих колоній. Тому після 5-6 доби облік кількості грибів (КУО) при будь-якій температурі проводити було недоцільно. Але і в старих культурах характерні та специфічні ознаки можливих токсигенних мікроміцетів (видові показники) не змінювались. При висіві представників поверхневої мікобіоти із зерен пшениці на агар Сабуро, було підтверджене певне прискорення швидкості росту мікроміцетів при зміні температури з 23°C до 32°C, як це відбувалось на агарі Чапека.

Цікаво, що на агарі Сабуро, поряд з грибами родів *Aspergillus* та *Alternaria* зростала значна кількість колоній, мікроби яких за попереднім аналізом висівів було віднесено до роду *Penicillium*. Обрахована раніше кількість пеніцилів, отриманих на АЧ в дослідях №1 та №2, була мізерною (1,5%). Загалом, при різних температурах у чашках Петрі з агаром Сабуро було виділено приблизно однакову кількість грибів родів *Penicillium* та *Aspergillus* (29% проти 27,4%

відповідно), і трохи менше – грибів роду *Alternaria* (19,4%), що складало 75% від загальної кількості колоній мікроміцетів (рис.9).

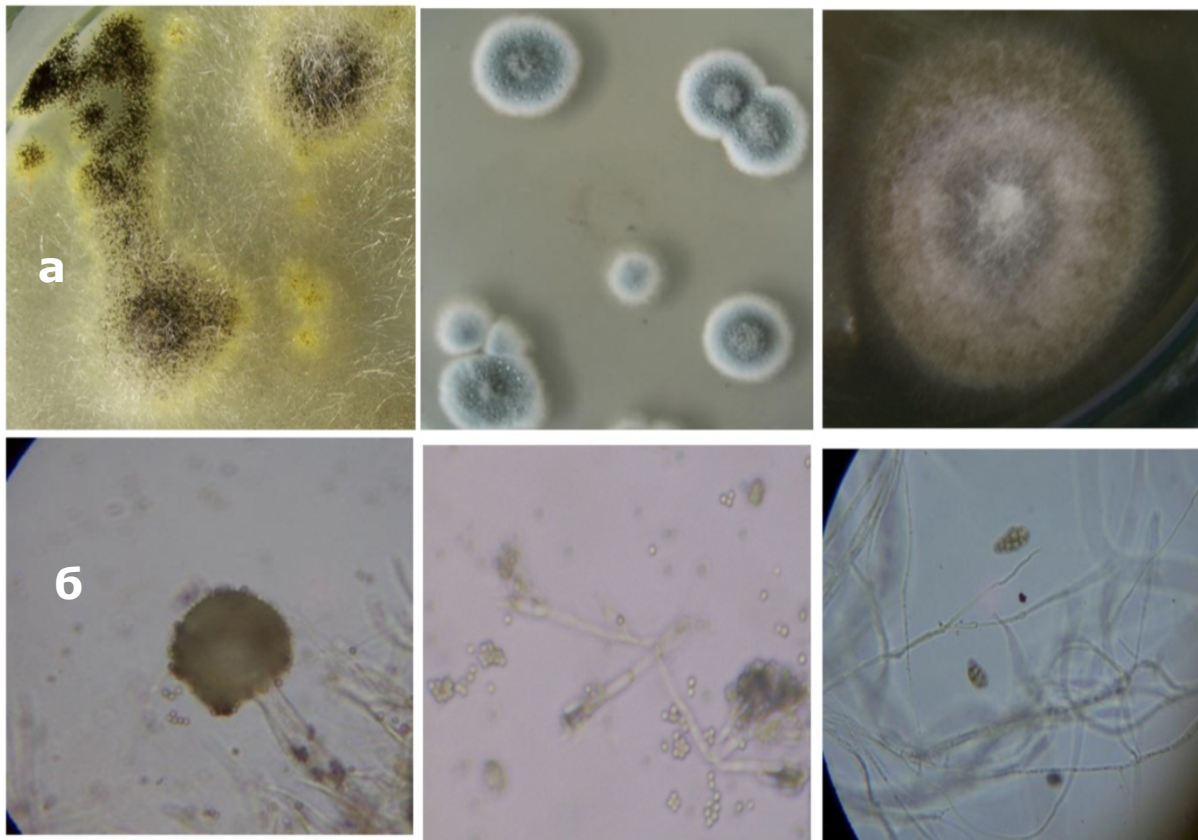


Рис. 9 Представники родів *Aspergillus* , *Penicillium* та *Alternaria* з агару Сабуро:

а – колонії з характерними культуральними ознаками;

б – специфічні морфологічні ознаки грибів.

Інтенсивний розвиток пеніцилів на агарі Сабуро може пояснюватись особливостями метаболізму цих мікробів. Хоча гриби даного роду здатні розщепити і сахарозу АЧ, і глюкозу АС, їм для розвитку потрібні і білкові сполуки, які абсолютно відсутні в складі агару Чапека.

В дослідях №3 та №4 неідентифікованих колоній було близько 25%. Ці поодинокі сукупності мікроміцетів взагалі не належали можливим збудникам мікотоксикозів (мукоральні гриби), тому і не потребували подальших досліджень.

Висновки до розділу 2

При виконанні мікологічних досліджень зразків фуражної пшениці (компонент готових раціонів свиней в ТОВ «Агро-ПЕК», Житомирський район) виявили високий рівень їх контамінації зародками мікроскопічних грибів. Ріст за різних температур, на ряді спеціальних поживних середовищ дозволив встановити швидкість колонізації зернин мікробами з морфологічної підгрупи «Міцеліальні гриби», видове різноманіття мікроміцетів, з яких складалась асоціація на поверхні зерен. Приналежність матеріалу підозрілих грибних колоній до відповідних родів була доведена після докладного вивчення їх культуральних ознак та співставлення результатів власних мікроскопічних досліджень із даними мікологічних атласів, довідників, авторських статей [37-39, 42]. Виявилось, що з поверхнею зерен досліджуваних зразків пшениці асоційовані такі небезпечні продуценти токсинів як *Aspergillius*, *Alternaria*, *Penicillium* та *Fusarium*.

На швидкість росту міцеліальних грибів впливав ряд факторів:

- поживність середовища. Із збільшенням відсотку органічних компонентів у поживному середовищі прискорюються темпи розвитку різних видів грибів. Це стосується і швидкості розвитку гіфів міцелію (пов'язане із розміром колоній), і часу появи репродуктивних структур (пігментація колонії внаслідок конідієутворення). Інтенсивність прояву зазначених ознак на агарі Сабуро завжди була більше, ніж на агарі Чапека.

- температурний режим (режим культивування аналогічний певним кліматичним параметрам). Температура в 32°C завжди сприяла швидшому дозріванню міцеліальних грибів, хоча кількість заражених грибами зерен пшениці по закінченню 10-ї доби експерименту на достовірно не відрізнялась.

РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Одним з основних компонентів корму для свиней залишаються зернові культури. Вони є компонентами концентрованих кормів і основним джерелом протеїну в свиноводстві. Особливої уваги в якості білкової складової заслуговує фуражна пшениця. В порівнянні з продовольчим зерном в неї дещо нижчі споживчі та поживні якості, але безапеляційно вона – цінний компонент раціонів для свиней, зважаючи на високу конвертацію корму та швидкий ріст цих тварин [43-45]. Але використання зернових завжди таїть у собі небезпеку отруєння тварин метаболітами мікроскопічних грибів – мікотоксинами [10]. В польових умовах ці автохтонні мешканці ґрунтів постійно потрапляють на рослини, складаючи їх епіфітну мікобіоту.

Регулювати процес зараження ними в природних умовах – витратно, неефективно, а – здебільше, і неможливо [23,46]. Ефективно контролювати рівень мікологічної забрудненості зерна можна лише на етапі його зберігання. Через це в зернових терміналах чи в інших сховищах малої місткості створюють умови (температура, вологість), що унеможливлюють розвиток та поширення мікроміцетів [46].

Проведений експеримент мав виявити спектр міцеліальних грибів, наявний на зразках фуражної пшениці. Її вирощували в 2020 р. , збирали влітку того ж року, і температури в період збору коливались в діапазоні 23-32 ° С (вдень) та 15-17 ° С (вночі). Гриби – типові мезофіли, тому в температурному інтервалі від 20 до 35°C процеси їх життєдіяльності відбуваються оптимально. Для виявлення мікробів, які колонізували пшеницю в польових умовах нами, для лабораторних культур, були вибрані 2 діапазони вирощування посівів (23 ° С та 32°C) та 2 поживних середовища, що принципово відрізнялись наборами наявних в них органічних речовин.

На першому середовищі (агар Чапека) з одною органічною речовиною (сахароза) на 10-ту добу від моменту висіву рівень обсіменіння зерен (92-95%)

та загальна кількість колоній грибів були практично однаковими як за температури 23, так і за 32°C. Друге середовище (агар Сабура) містило різноманітний набір мономерних органічних речовин чи їх похідних (амінокислоти, пептиди, жирні кислоти тощо) та інший вуглевод (декстроза). Тотальне обсіменіння зерен на ньому (100%) виявлялось раніше, ніж на агарі Чапека, а ріст колоній грибів був значно активнішим (скоротився час до появи спор). Тому облік результатів на агарі Сабура ми провели вже на 5-6-ту добу від моменту висіву.

Таким чином було доведено, що зародки «польових» грибів, що колонізували дану партію фуражної пшениці, тривалий час лишаються активними, здатними колонізувати нові субстрати. І після складського зберігання представники мікробної асоціації, за певних умов, досить швидко уражали понад 90% зерен в кожній повторності. Це простежувалось навіть на «бідному» середовищі (агар Чапека), у якому джерелом карбону було одна органічна речовина.

Наші результати також показують наявність на зерні пшениці таких небезпечних продуцентів мікотоксинів як *Aspergillius*, *Alternaria*, *Penicillium* та *Fusarium*. Дослідження щодо спектру грибів-контамінантів були проведені нами не лише на середовищах з принципово різним складом, але й за використання 2-х температур (нижня та верхня межа температурного інтервалу для мезофілів). Це дозволило виявити роди та види мікроміцетів, що «оселились» на зерні за тих чи інших умов розвитку рослин під час їх природного зростання. Представники зазначених вище видів можуть забруднити зерно «коктейлем» з отруйних речовин із синергічною дією. Вони можуть одночасно виділяти афлатоксини (тип А і В), моніліформін, зеараленон, охратоксин, деоксиліваленон, трихотицени двох типів (тип А та В), альтернаріол та монометилловий ефір. Останні 2 речовини є персональними метаболітами грибів роду *Alternaria* і виявляють значну генотоксичність [42].

Одним з негативних ефектів впливу мікотоксинів на організм є підтримання та посилення запальних реакцій. Афлатоксин, охратоксин, патулін

та фуозин підсилюють наявні запальні реакції в організмі, сповільнюють загоєння [47, 48]. Саме такі ефекти наносять найбільшу економічну шкоду тваринництву, оскільки господарники постійно мають витрачати час та гроші на ліквідацію запалень невідомої чи недостовірної етіології («необов'язкові» витрати).

Сьогодні на провідні позиції виходить імуносупресивна активність мікотоксинів як ефект, що спостерігається часто і масово. Найбільш чутливими до впливу мікотоксинів є Т- і В-лімфоцити (через постійну проліферацію та диференціацію цих клітин). Саме завдяки впливу на клітини, що повинні весь час оновлюватись і взаємодіяти з іншими імуноцитами, виникають порушення комунікативного зв'язку між різними клітинною та гуморальною ланками імунного захисту [19,47,48].

Швидкість росту вегетативних гіфів грибів, розвиток їх репродуктивних органів та інтенсивність спороношення відповідає генетичним ознакам певних ізолятів токсиноутворювачів. За температури 32° С, при рості впродовж 5 діб, 82% вирощених на агарі Чапека колоній належали аспергилам і альтернаріям, 75% колоній з агару Сабуро – пеніцилам, аспергилам та альтернаріям. За температури 23° С таке співвідношення мікробів виростало на чашках Петрі за 5-6 діб (агар Сабуро) або за 10 діб (агар Чапека). Встановлена швидкість росту грибних контамінантів свідчила, що більшість виділених ізолятів краще реалізують власний генетичний потенціал при температурах більше 30° С, в умовах забезпечення їх різноманітними органічними мономерами.

Наявність мікроскопічних грибів певних видів ще не є прямим свідченням можливого отруєння тварин. Але дана проблема реально існує, оскільки тваринники постійно повідомляють про часту реєстрацію хронічних мікотоксикозів (імунодепресія, порушення фертильності, виникнення факторних захворювань), які стають причинами значних економічних збитків.

Висновки до розділу 3

Спектр токсиноутворювачів на зернах фуражної пшениці в Житомирському Поліссі визначають літні температури, за яких формується епіфітна мікобіота рослини. Тому в місцях для збереження кормів наявні такі умови: низькі постійні температури, обмеження вологості, відсутність шкідників, які збільшують білкову компоненту зернових. Сукупність цих факторів стримує розвиток міцеліальних грибів і — через відсутність температурного стресу тощо — не дозволяє їм синтезувати мікотоксини.

Остаточна безпечність компонентів корму встановлюється після отриманих результатів токсикологічного аналізу. Без проведення токсикологічної діагностики відвантаження партій зерна (зібрані в Житомирському Поліссі влітку 2020 р., мають якісні органолептичні показники) із сховища в кормоцех та у цеха підприємства має відбуватись невеликими партіями, час зберігання яких нормується в залежності від імовірної швидкості росту клітин міцелію та утворення великої кількості зрілих конідій на поверхні колоній наявних грибів-контамінантів .

ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ

1. В досліджених зразках фуражної пшениці виявлені міцеліальні багатоклітинні гриби, що можуть виділять небезпечний для свиней набір з десяти мікотоксинів – представники родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* та *Alternaria*.

2. Для отримання повного уявлення про склад грибної асоціації, зародки якої знаходяться на зернових компонентах готових кормосумішей, слід використовувати 2 поживних середовища, призначених для розвитку грибів (агар Чапека, агар Сабуро). На агарі Чапека переважали аспергіли (53%) та альтернарії (27%), кількість грибів роду *Penicillium* була незначною (1,5%), при різ знижених температурах повільно розвивались гриби роду *Fusarium* (8%). На агарі Сабуро співвідношення видів, їх відсотковий зміст були іншими: гриби роду *Penicillium* переважали над аспергілами (29% проти 27% відповідно), також виявлялись гриби роду *Alternaria* (19%).

3. Зміна температури інкубації зразків з 23°C на 32°C, на 3-5 днів прискорює дозрівання колоній продуцентів мікотоксинів, що ростуть навколо зерен фуражної пшениці на середовищах однакового складу.

4. Для підтримання мікотоксичної безпечності кормосумішей навесні та влітку перемелювати їх зернові компоненти слід *extempore* (кожні 2 доби за температури довкілля 32°C або кожні 5 діб – при 23°C).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Cranfield J.A.L. Framing consumer food demand responses in a viral pandemic. *Canadian Journal of Agricultural Economics. Revue Canadienne D'agroeconomie*. 2020. Vol. 68 No. 2, P. 151–156. doi: <https://doi.org/10.1111/cjag.12246>
2. Ткаченко, С. Шляхи залучення інвестицій в економіку сільського господарства України. *Recommended for publication by the scientific council Lesya Ukrainka Volyn National University*. 2021. Vol. 210, P. 226-230.
3. Хаба Г.М., Горновська С.В. Перспективи Впровадження інноваційних технологій в сільському господарстві України. *Ефективність агротехнологій Житомирщини: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції (10-12 листопада)*, Житомир : ЖАТФК. 2021, С. 122-123.
4. FAO. (March 2022). *Crop Prospects and Food Situation. Quarterly Global Report No. 1*. FAO, Rome. [Internet Resource]. doi: <https://doi.org/10.4060/cb8893en>
5. Кісіль М. Інвестиційне забезпечення розвитку сільського господарства України в стратегічній перспективі. *Вісник аграрної науки*. 2018. Т. 96 № 1, С. 78-82. doi: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201801-13>
6. FAO. Food Price Monitoring and Analysis (FPMA) / Bulletin No. 3. GIEUS. 13 April 2022.
7. Trading Economics. *World wheat's price changing. Forecast – Price – Quote – Chart*. [Internet source] Accessed at: <https://tradingeconomics.com/commodity/wheat>
8. Денисенко М.П., Новіков Д.В. Сучасний стан та перспективи розвитку сільського господарства України. *Агросвіт*. 2019. № 12, С. 15-21. doi: [10.32702/2306-6792.2019.12.15](https://doi.org/10.32702/2306-6792.2019.12.15)
9. Braimoh A., Manyena B., Obuya G., Muraya F. 2018. Assessment of Food Security Early Warning Systems for East and Southern Africa. *Africa Climate*

Business Plan series. World Bank, Washington, DC. License: Creative Commons Attribution CC BY 3.0 IGO. Accessed at: <http://hdl.handle.net/10986/29269>

10. FAO. Рекомендуемые нормы и правила по предотвращению и уменьшению загрязнения микотоксинами хлебных злаков. *CAC/RCP 51-2003. CODEX ALIMENTARIUS*. 2016. 16 р.

11. Курдиш І.К. Роль мікроорганізмів у відтворенні родючості ґрунтів. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2009. Т. 9, С. 7-32. URL: <http://dspace.nbu.gov.ua/handle/123456789/26158>

12. Ingenbleek L., Sulyok M., Adegboye A., Hossou S. E., et al. Regional Sub-Saharan Africa total diet study in Benin, Cameroon, Mali and Nigeria reveals the presence of 164 mycotoxins and other secondary metabolites in foods. *Toxins*. 2019. Т. 11 No. 1, P. 54. doi: <https://doi.org/10.3390/toxins11010054>

13. Ігнатюк І.В., Букалова О.В. Аналізування показників безпечності та якості кукурудзяного комбікорму для продуктивних тварин. *Актуальні проблеми ветеринарії*. Біла Церква, Україна. 2019. С. 22-24

14. Антоняк Г.Л., Бабич Н.О., Стефанишин О.М., Коваль Н.К., Федяков, Р.О. Афлатоксини: Біологічні ефекти та механізми впливу на організм тварин і людини. *Біологія тварин*. 2009. Т. 11 № 1-2, С. 16-26.

15. Демидов О.А., Муха Т.І., Гуменюк О.В. Вплив абіотичних чинників на розвиток хвороб пшениці озимої. *Пропозиція*. 2021. № 1, С. 60-63. URL: <http://rep.btsau.edu.ua/handle/BNAU/5992>

16. Vlasenko V.V. Modern views on the influence of pathogens in agrophytocenosis for feed harvesting and conserving. *Feeds and Feed Production*. 2012. № 74, С. 202-207. URL: <https://fri-journal.com/index.php/journal/article/view/710>

17. Satyanarayana T., Deshmukh S.K., Deshpande M.V. (Eds). *Advancing frontiers in mycology & mycotechnology: basic and applied aspects of fungi*. Springer, Nature. 2019. P. 299-404.

18. Головчак Н. Структура та вплив мікотоксинів на живі організми. *Вісн. Львів. ун ту. Сер. біол.* 2007. Т. 43, С. 33-47.

19. Макарчук М.О. Мікотоксини-накопичення у зерні та їх згубний вплив / The 15 th International scientific and practical conference. *MODERN SCIENCE AND PRACTICE*. Varna, Bulgaria. 2020, May, P. 286-288.
20. Riba A., Bouras N., Mokrane S., Mathieu F., et al. Aspergillus section Flavi and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology*. 2010. Vol. 48 No. 10, P. 2772-2777. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.005>
21. Qiu J., Xu J., Shi J. Fusarium toxins in Chinese wheat since the 1980s. *Toxins*. 2019. Vol. 11 No. 5, P. 248. doi: <https://doi.org/10.3390/toxins11050248>
22. Ferrigo D., Raiola A., Causin R. Fusarium toxins in cereals: Occurrence, legislation, factors promoting the appearance and their management. *Molecules*. 2016. Vol. 21 No. 5, P. 627. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules21050627>
23. Milani J.M. Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: a review. *Veterinarni Medicina*. 2013. Vol. 58 No. 8, P. 405-411.
24. Ezekiel C.N. Необходимость комплексных подходов к управлению рисками для безопасности пищевых продуктов: пример проблемы микотоксинов в Африке. *Future Food Safety*. FAO. IFSC_1/19/TC1.5. 2019. Accessed at: <https://www.fao.org/3/CA3313RU/ca3313ru.pdf>
25. Bryden W.L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*. 2012. Vol. 173 No. 1-2, P. 134-158. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.014>
26. Малигіна В.Д., Ветрова Е.В., Рябченко Н.А., Павлова В.А., Федоренко В.П. *Біопішкодження рослинних ресурсів и продовольчої сировини*. За ред. В.Д. Малигіної. Київ: Кондор. 2000. 246 с.
27. Kozij B.I., Sloboda O.M., Stepanjuk O.I. Математична модель оцінки впливу якості кормів на продуктивність тварин. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series Economical Sciences*. 2015. Vol. 17 No. 1, P. 226-233. URL: <https://nvlvet.com.ua/index.php/economy/article/view/3418>

28. Нагорна Л., Проскуріна І., Нестерук В. Моніторинг мікологічного забруднення кормів Сумської області. *Матеріали III Всеукраїнської науково-практичної Інтернет-конференції «Сучасні проблеми біобезпеки в Україні»*. 2020. С. 44-46.
29. Лясота В.П., Малина В.В., Гришко В.А., Булей Н.В., Балацький Ю.О. *Гігієнічна оцінка кормів: Методичні вказівки для проведення лабораторно-практичних і практичних занять зі студентами біолого-технологічного факультету та факультету ветеринарної медицини (повторне видання)*. Біла Церква: БНАУ. 2015. 47 с. URL: <http://rep.btsau.edu.ua/handle/BNAU/1674>
30. Брезвин О.М. Моніторинг кормової сировини Західного регіону України. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. Гжицького*. 2012. Т.14 № 2 (2), С. 182-187.
31. Антоняк Г.Л., Бабич Н.О., Стефанишин О.М., Коваль Н.К., Федяков Р.О. Афлатоксини: Біологічні ефекти та механізми впливу на організм тварин і людини. *Біологія тварин*. 2009. Т. 11 № 1-2, С. 16-26. doi: <https://www.researchgate.net/publication/280559699>
32. Fung F., Clark R.F. Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 2004. Vol. 42 No. 2, P. 217-234. doi: <https://doi.org/10.1081/CLT-120030947>
33. *Географічне розташування та кліматичні умови. Житомищина. Інвестиційний портал*. [Інтернет ресурс]. Режим доступу: <http://ztinvest.gov.ua/ua/pro-region/geografichne-roztashuvannya-ta-klimatichni-umovi/>
34. World Meteorological Organization. Weather observations. Zhytomyr Region. [Internet source]. Available at: <https://worldweather.wmo.int/en/home.html>
35. *Названо регіони України із найвищою урожайністю пшениці. AgroPolit.com: Гаряча агрополітика*. 2021. [Інтернет-ресурс]. Режим доступу:

<https://agropolit.com/news/21281-nazvano-regioni-iz-nayvischoyu-urojaynistyu-pshenitsi>

36. Наказ 264. України (22.05.2019). Про затвердження Методів відбору зразків для визначення максимально допустимих рівнів мікотоксинів у харчових продуктах для цілей державного контролю. *Верховна Рада України*.
37. Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Landry M.L., Pfaller M.A. *Manual of clinical microbiology: Volume 1* (No. Ed. 9). ASM press. 2006. 1149 p.
38. *BBL Manual of Products and Laboratory Procedures*. 5th ed. BBL Division of Becton: Dickinson and Company. 1968. 210 p.
39. Кириленко Т.С. *Атлас родов почвенных Грибов*. Київ: Наукова думка. 1977. 127 с.
40. Barnett H.L. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 2d. Burgess: Publishing Co. 1960. 231 p.
41. Krska R., Welzig E., Boudra H. Analysis of Fusarium toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology*. 2007. Vol. 137 No. 3-4, P. 241-264. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.004>
42. Aichinger G., Del Favero G., Warth B., Marko D. Alternaria toxins—Still emerging? *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2021. Vol. 20 No. 5, P. 4390-4406. doi: 10.1111/1541-4337.12803
43. Хіміч О.В., Здор Л.П., Лаптеєв О.О., Семенова О.І. Ефективність норм введення зерна тритикале у раціонах молодняку свиней. *Корми і кормовиробництво*. 2018. № 85, С. 125-131.
44. Mykhalko O.H. Сучасний стан та шляхи розвитку свинарства в світі та Україні. *Bulletin of Sumy National Agrarian University. The series: Livestock*. 2021. Vol. 3 No. 46, P. 61-77. doi: <https://doi.org/10.32845/bsnau.lvst.2021.3.9>
45. Дяченко Л.С., Сивик Т.Л., Титарьова О.М. Годівля свиней. Біла Церква, БНАУ. 2020. 53 с.
46. Hu F., Tu X.F., Thakur K., Hu F., et al. Comparison of antifungal activity of essential oils from different plants against three fungi. *Food and Chemical Toxicol*. 2019. Vol. 134, P. 110821. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110821>

47. Cheng Y.H., Weng C.F., Chen B.J., Chang M.H. Toxicity of different Fusarium mycotoxins on growth performance, immune responses and efficacy of a mycotoxin degrading enzyme in pigs. *Animal Research*. 2006. Vol. 55 No. 6, P. 579-590. doi: 10.1051/animres:2006032

48. Oswald I.P., Marin D.E., Bouhet S., Pinton P., et al. Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. *Food additives and contaminants*. 2005. Vol. 22 No. 4, P. 354-360. doi: <https://doi.org/10.1080/02652030500058320>