

КОНТАМІНАЦІЯ УКРАЇНСЬКОГО БДЖОЛИНОГО ОБНІЖЖЯ ГРИБАМИ РОДУ *FUSARIUM*

О. О. ЗАСТУЛКА, аспірант* кафедри ветеринарно-санітарної експертизи
О. М. ЯКУБЧАК, доктор ветеринарних наук, професор, завідувач кафедри
ветеринарно-санітарної експертизи

**Національний університет біоресурсів і природокористування
України**

Л. О. СОЛОДКА, кандидат біологічних наук, доцент кафедри
мікробіології, фармакології та епізоотології

Житомирський агроекологічний університет

E-mail: o.zastulka@gmail.com

Анотація. Метою нашого дослідження було виявлення в пробах бджолиного обніжжя, зібраного в Україні в 2015–2016 роках, потенційно токсигенних грибів роду *Fusarium*. Було досліджено 7 проб 2015 р. та 15 проб 2016 р. збору, які відповідали національному стандарту за кислотністю 2% водного розчину та вмістом флавоноїдів. Бджолине обніжжя в розведенні 1:10 та 1:20 декілька разів у 2–3 повторях висівали глибинним методом на агар Чапека та агар Сабуро з глюкозою і вирощували за температури 25° С 5–7 діб.

В окремих партіях бджолиного обніжжя, органолептичні та фізико-хімічні показники яких відповідали ДСТУ 3127-95, були виявлені гриби роду *Fusarium* в кількості 20–83 КУО/ на 1 г продукту (2015 р.) та 15–102 КУО/г (2016 р.).

Дані гриби здатні до виділення ряду токсинів і тому є потенційно небезпечними складовими біологічно активних добавок для людей і тварин. Тому, під час виконання мікробіологічних досліджень товарних партій бджолиного обніжжя доцільно виявляти гриби даного роду, а використану для цього процедуру – внести до нормативно-правових актів.

Ключові слова: бджолине обніжжя, біологічно активна добавка (БАД), мікроскопічні гриби, колонієутворюючі одиниці (КУО), культуральні і морфологічні ознаки грибів роду *Fusarium*, токсигенність.

Актуальність. Спори та уламки гіфів ґрунтових мікроміцетів, зокрема, роду *Fusarium* легко потрапляють на квіткові рослини і можуть концентруватися в бджолиному обніжжі. Загальновідомо, що гриби вищезазначеного роду за певних обставин здатні утворювати ряд токсичних речовин (трихотецени, енніатини, зеараленон, фумонізін, моніліформін, фузарін), які зберігаються в кормах і продуктах харчування

впродовж тривалого часу [1]. Саме тому виділення представників роду *Fusarium* на перших етапах контролю обніжжя дозволить знизити ризики під час вживання біологічно активної добавки (БАД).

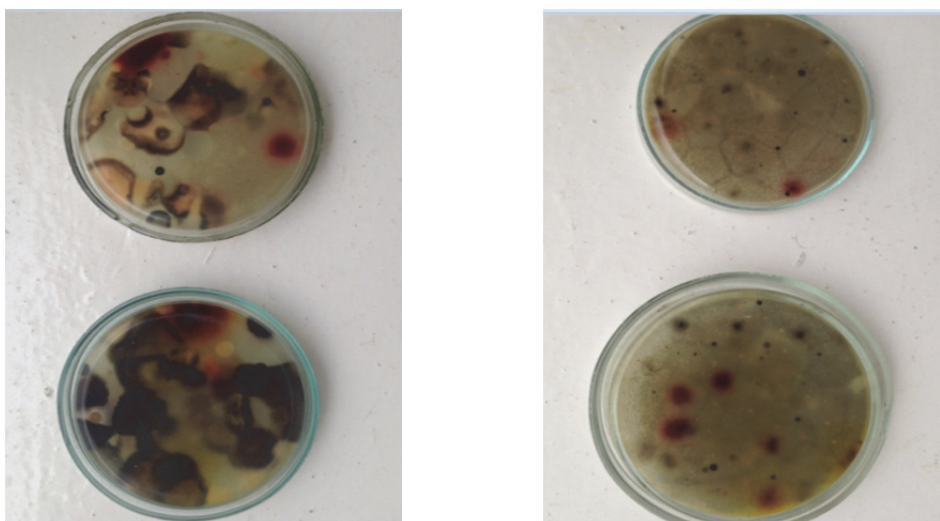
Аналіз останніх досліджень та публікацій. Гриби роду *Fusarium* вперше отримали таксономічний статус в 1809 році. В 1935 р. німецькі мікологи Wollenweber та Reinking, завдяки опису типів спороносіння, вигляду конідій та кількості перетинок у них, розділили відомі ізоляти на 66 видів. У 50-70-х роках американські вчені Snyder та Hansen, радянські вчені Райлло та Білай, англійець Booth зменшили кількість видів даного роду до 31-55 [2, 3]. В роках американські вчені Snyder та Hansen, радянські вчені Райлло та Білай, англійець Booth зменшили кількість видів даного роду до 31-55 [2, 3]. В сучасній таксономічній системі за Nelson, Toussoun та Marasas (1983 р.) рід *Fusarium* представлений 30 видами, які виділяють із ґрунту та рослин в країнах різних континентів: Україна, Білорусь, Молдова, Прибалтика, Росія, Болгарія, Румунія, Польща, Чехія, Словаччина, Угорщина, Німеччина, Франція, Італія, Ірландія, Фінляндія, Норвегія, Індія, Китай, Південна Корея, Канада, США, Австралія, ЮАР [4, 5].

Мета досліджень. Провести мікробіологічні дослідження бджолиного обніжжя, зібраного в Україні в 2015-2016 роках, на потенційно токсигенні гриби роду *Fusarium*.

Матеріали і методи дослідження. Мікробіологічному аналізу підлягали партії продукту, які надходили на сільськогосподарські ярмарки в ННЦ «Інститут бджільництва ім. П. І. Прокоповича». Було досліджено 7 проб бджолиного обніжжя 2015 року та 15 проб – 2016 року збору, які відповідали національному стандарту за кислотністю 2% водного розчину та вмістом флавоноїдів. Бджолине обніжжя в розведенні 1:10 та 1:20 декілька разів в 2-3 повторях висівали глибинним методом на агар Чапека та агар Сабуро з глюкозою і вирощували за температури 25 °С впродовж 5-7 діб. Під час аналізу висівів звертали увагу на колонії з культуральними ознаками, характерними для фузаріїв, останні пересівали на селективне середовище з метою отримання чистої культури. Матеріал молодих та зрілих колоній чистих культур піддавали мікроскопії методами «розчавленої краплі» та простого фарбування.

Результати дослідження та їх обговорення. За даними довідників та визначників в колоніях роду *Fusarium* наявний добре розвинений, білий, рожевий чи жовтуватий павутиноподібний високий повітряний міцелій, а строма колоній – пурпурна або охряно-жовта. Саме такі колонії регулярно, в результаті висіву суспензій обніжжя, з'являлись на агарі Чапека в розведенні 1:10, іноді – в розведенні 1:20 (рис.1, табл.1).

На агарі Сабуро подібні колонії не реєструвалися. Це співпадає з результатами досліджень, в яких повідомляється про виявлення представників роду *Fusarium* під час перевірки якості 90 проб обніжжя, виготовленого у Вірменії та Словаччині [6].



а)

б)

Рис. 1. Зворотний бік пігментованих колоній у висівах проб обніжжя на агарі Чапека: а) – № 28 (Черкаська обл., 2016 р.); б) – № 18 (Хмельницька обл., 2016 р.)

1. Кількість колоній грибів з культуральними ознаками, характерними для роду *Fusarium*, в товарних партіях українського обніжжя (с.-г. ярмарки, м. Київ)

Роки	Загальна к-ть проб (шт.)	К-ть проб, нормованих за рН та вмістом флавоноїдів (% до загальної кількості)	К-ть характерних колоній на агарі Чапека за розведення 1:10, $M \pm m$ (КУО / г обніжжя) та похибка середнього (%)	Номер проби та регіон виготовлення обніжжя
2015	26	7 шт. (26,9%)	25 $\pm$ 5 (20%)	№1 Полтавська
			13 $\pm$ 3 (23,1%)	№10 Черкаська
			85 $\pm$ 5 (5,9%)	№12 Хмельницька
			15 $\pm$ 3 (19%)	№5 Вінницька
2016	41	15 шт. (36,6%)	102 $\pm$ 26 (30%)	№21 Чернігівська
			20 $\pm$ 3 (14,5%)	№15 Черкаська
			56 $\pm$ 9 (15,5%)	№22 Черкаська
			32 $\pm$ 9 (27,7%)	№24 Черкаська
			52 $\pm$ 10 (20%)	№28 Черкаська
			36 $\pm$ 6 (15,8%)	№19 Полтавська
			57 $\pm$ 8 (14,1%)	№18 Хмельницька

Таким чином, колонії зі специфічними ознаками були виявлені в 43 % пробах 2015 року виготовлення і в 53 % – 2016 року. Отже, було встановлено, що більше половини досліджених за 2 роки проб контаміновані грибами в кількості 15–36 КУО/г. Мікробні клітини з колоній можна віднести до певного роду грибів лише після опису структури колоній, їх поверхні, пігментації повітряного міцелію та субстрату та вивчення морфології клітин мікроміцетів. Для цього із колоній з характерними ознаками на агарі Чапека шляхом 2-х або 3-х пересівів виділяли чисті культури (рис. 2).

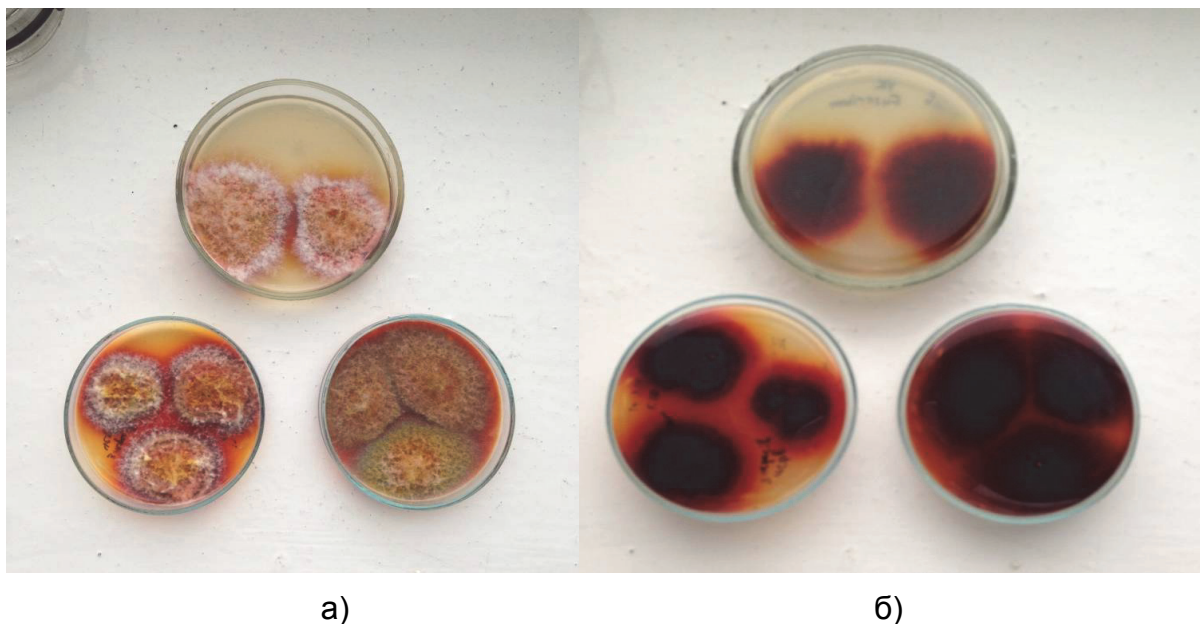


Рис. 2. Вигляд міцелію (а) та зворотного боку (б) колоній в чистих культурах (2016 р.)

Отримані колонії характеризуються клочкуватою, павутинною структурою поверхні, нерівним краєм, жовтуватим кольором центральної частини, часто – біло-рожевою, іноді – жовто-зеленою периферією, інтенсивною жовто-червоною пігментацією поживного середовища навкруг молодих колоній або червоно-коричневою – навколо зрілих. Для ідентифікації мікроміцетів роду *Fusarium* за допомогою мікроскопії необхідно виявити конідії характерної форми і структури: серповидні чи ланцетовидні макроконідії з 3-7 перетинками, одноклітинні еліптичні мікроконідії (у формі лимона, груші, яйця) з 1-3 перетинками [7]. В старих колоніях часто наявні хламідоспори декількох типів (рис.3).

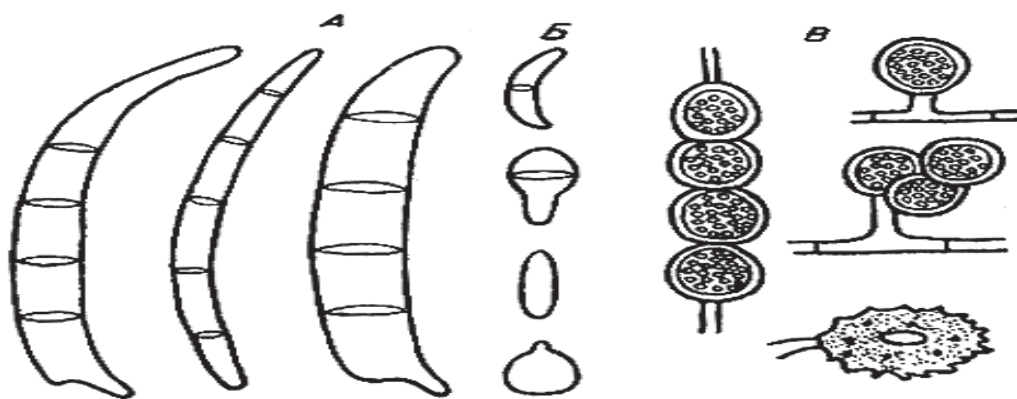


Рис. 3. Репродуктивні структури грибів роду *Fusarium*: А – макроконідії; Б – мікроконідії; В – хламідоспори

В матеріалі із старих пігментованих колоній, отриманих внаслідок висіву обніжжя виробництва 2015-2016 років під час мікроскопії виявлялись хламідоспори, специфічні для фузаріїв (рис.4). Ні в колоніях первинного висіву, ні в чистих культурах макроконідій виявлено не було. Це не повинно дивувати, оскільки частина видів роду (*F. poae*, *F. solani*) формує ці структури лише на спеціальних середовищах.

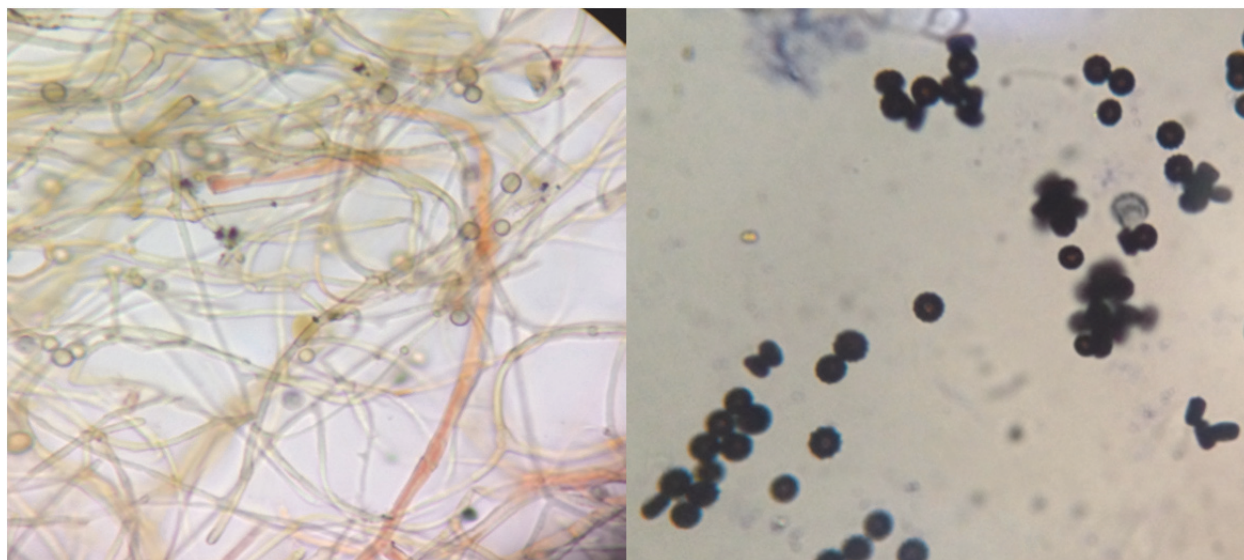
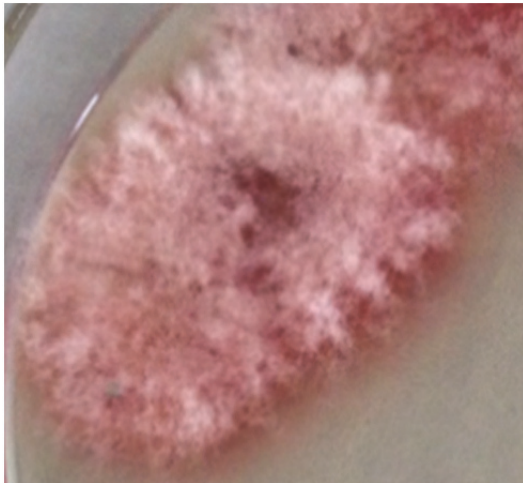


Рис. 4. Хламідоспори грибів, виділені із старих колоній

На наступному етапі досліджень необхідно було визначити видову належність ізолятів. За культуральними ознаками (вигляд гіфів повітряного міцелію, пігментація строми, кратеро-подібний центр) колонії, виділені в 2015 році, схожі на представників виду *Fusarium culmorum*, хоча залежно від умов вирощування колір повітряного міцелію у даного виду може суттєво відрізнятися (рис. 5). Аналіз культуральних ознак лише в окремих випадках дозволяє провести видову ідентифікацію. Саме тому за виглядом колоній на рис. 2 зробити чіткі висновки про видову належність культур або встановити представникам одного чи двох різних видів вони є неможливим.



а)



б)

Рис. 5. Колонії грибів: а) виділені в експерименті із обніжжя 2015 р.; б) *Fusarium culmorum* за матеріалами сайту old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/fus.htm

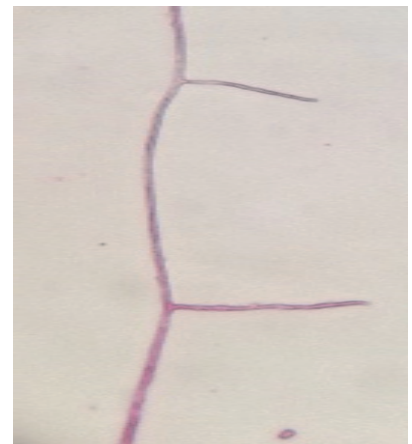
Мікроскопія живих та фарбованих препаратів дозволила виявити в пробах 2016 року гіфи з поширеним у грибів моноподіальним гілкуванням та мікроконідії (рис.6, 7).



а)



б)



в)

Рис. 6. Мікроскопічні препарати: а) *F. ventricosum* за матеріалами Watanabe Tsuneo [8], б) та в) мікрофотографії, отримані в експерименті

На рисунках 6 і 7 видно, що гіфи під різними кутами відходять від основної нитковидної клітини, а мікроконідії мають кулясту або еліптичну форму і найчастіше розташовані не групами, а поодиночці. Співставлення отриманих препаратів з мікрофотографіями інших дослідників [7, 8] дозволяє припустити, що ізоляти 2016 р. належать до виду *F. ventricosum* та морфологічно близького до нього виду *F. solani*.

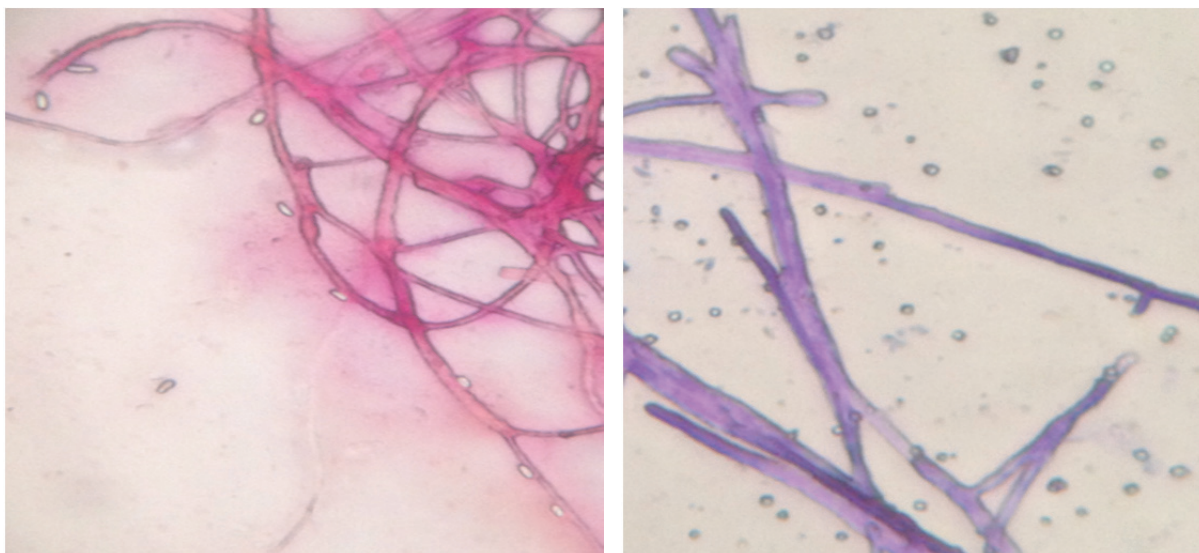


Рис. 7. Вигляд мікроконідій у препаратах

Висновки і перспективи досліджень.

1. В окремих партіях товарного обніжжя виробництва 2015 року були виявлені гриби роду *Fusarium* в кількості 20-83 КУО/г, у 2016 році – в кількості 15-102 КУО/г (Черкаська, Вінницька, Полтавська та Хмельницька області).

2. Культури грибів, виділені з бджолиного обніжжя, за культуральними та морфологічними ознаками можуть бути віднесені до видів *Fusarium culmorum*, *Fusarium ventricosum* та *Fusarium solani*.

3. Докладна видова ідентифікація грибів дозволить визначити можливий перелік токсинів, що будуть застосовані в якості контролю під час проведення хроматографічних досліджень або імуноферментного аналізу партій обніжжя та допоможе розробити чітку лабораторну процедуру для подальшого внесення в ДСТУ 3127-95 «Обніжжя бджолине» або інший нормативно-правовий акт.

Список використаних джерел

1. Тутельян, В. А. Микотоксины / В. А. Тутельян, Л. В. Кравченко. – Москва: МГУ – 1985. – 295 с.
2. Билай, В. И. Фузариин / В. И. Билай. – Киев: Наукова Думка, 1977. – 170 с.
3. Райлло, А. И. Грибы рода фузариум / А. И. Райлло; под ред. д. б. н. М. В. Горленко. – М.: Гос. изд-во с.-х. литературы, 1950. – 125 с.
4. Marasas, W. Toxigenic *Fusarium* Species: Identity and Mycotoxicology / W. Marasas, P. Nelson, T. Tousson. – Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1984. – 295 с.
5. Платонова, Ю. В. География грибов рода *FUSARIUM* (Литературный обзор) / Ю. В. Платонова, Н. А. Сурин. // Фундаментальные исследования. – 2004. – № 4. – С. 95-97.

6. К вопросу о контаминации обножковой пыльцы грибами и микотоксинами [Электронный ресурс] / К. М. Григорян, Я. Бриндза, М. П. Саргсян, Л. Л. Акобян // Международный научно-практический рецензируемый журнал «Иммунопатология, аллергология, инфектология» – Режим доступа : www.immunopathology.com/ru/article.php?download_pdf=24.

7. Leslie, J. The Fusarium Laboratory Manual / J. Leslie, B. Summerell. – 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA: Blackwell Publishing Professional. – 387 p.

8. Tsuneo, W. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species/Watanabe Tsuneo.—2nd ed. CRC Press LLC, 2000. – 486 p.

References

1. Tutelyan, V. A., Kravchenko, L.V. (1985). Mycotoxins [Mycotoxins]. Moscow. Moscow State University, 295.

2. Bilai, V. I., (1977). Fusarium [Fusariums]. Kiev. Naukova Dumka, 256.

3. Raillo, A. I. (1950). Fungi of the genus Fusarium [Fusarium fungi]. – Moscow. Gos. Publishing house of agricultural literature, 340.

4. Marasas, W., P. Nelson, P., Tousson, T., (1984). Toxigenic Fusarium Species: Identity and Mycotoxicology [Toxigenic Fusarium Species: Identity and Mycotoxicology] Pennsylvania. Pennsylvania State University Press, 278.

5. Platonova, Yu. V., Surin, N.A. (2004). Geography of fungi of the genus FUSARIUM (Literary Review) [Geography of fungi of the genus FUSARIUM (Literary review)]. Fundamental research. No. 4.95-97.

6. Grigoryan, K. M., Brindza, J., Sargsyan, M.P, Hakobyan, L. L. К вопросу о контаминуванні обножкової пилі грибами та микотоксинами [Elektronnyi resurs] [On the issue of contaminant pollen pollen with fungi and mycotoxins [Electronic resource] International peer-reviewed scientific journal "Immunopathology, Allergology, Infectology" - Mode access to the resource: www.immunopathology.com/en/article.php?download_pdf=24.

7. Leslie, J. B. Summerell B. The Fusarium Laboratory Manual – 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA: Blackwell Publishing Professional. 387.

8. Tsuneo, W. (2000). Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species.—2nd ed. CRC Press LLC, 486.

КОНТАМИНАЦИЯ УКРАИНСКОЙ ПЧЕЛИНОЙ ОБНОЖКИ ГРИБАМИ РОДА FUSARIUM

О. А. Застулка, О. Н. Якубчак, Л. А. Солодка

Аннотация. Целью нашего исследования было выявление в образцах пчелиной обножки, собранной в Украине в 2015-2016 годах, потенциально токсигенных грибов рода *Fusarium*. Было исследовано 7 образцов 2015 и 15 образцов 2016 года сбора, которые отвечали национальному стандарту по кислотности 2% водного раствора и содержанию флавоноидов.

Пчелиную обножку в разведении 1:10 и 1:20 несколько раз в 2-3 повторностях высевали глубинным методом на агар Чапека и агар Сабуро с глюкозой и выращивали при температуре 25 °С в течение 5-7 суток. В некоторых партиях пчелиной обножки, органолептические и физико-химические характеристики которой соответствуют ДСТУ

3127-95, были обнаружены грибы рода *Fusarium* в количестве 20-83 КОЕ/ на 1 г продукта (2015 г.) и 15-102 КОЕ/г (2016 г.).

Данные грибы способны выделять ряд токсинов, поэтому потенциально опасны при их наличии в биологически активных добавках для людей и животных. В микробиологических исследованиях товарных партий обножки желателно выявлять грибы рода *Fusarium*, а использованную для этого процедуру внести в нормативно-правовые акты.

Ключевые слова: пчелиная обножка, биологически активные добавки (БАД), микроскопические грибы, культуральные и морфологические свойства грибов рода *Fusarium*, колониеобразующие единицы (КОЕ), токсигенность.

MICROSCOPIC FUNGI (THE GENUS FUSARIUM) CONTAMINATION OF UKRAINIAN BEE POLLEN

O. Zastulka, O. Yakubchak, L. Solodka

Annotation. The aim of our study was to identify in samples of bee pollen harvested in Ukraine in the years 2015-2016, potentially toxigenic fungi of the genus *Fusarium*. 7 samples were examined in 2015 and 15 samples in 2016 that corresponded to the national standard for acidity 2% aqueous solution and the content of flavonoids. Bee pollen in dilution 1:10 and 1:20, several times, by 2-3 repetitions was deep seeded on agar Capek and agar Saburo with glucose and was grown at a temperature of 25°C for 5-7 days. In some parties of bee pollen were found fungi of the genus *Fusarium* in an amount of 20-83 CFU per 1 g (2015 year) and 15-102 CFU/g (2016 year). By organoleptic and physico-chemical parameters bee pollen were performed to the national standart 3127-95. These fungi are able to release a number of toxins and therefore are potentially dangerous components of dietary supplements for humans and animals. It is advisable to allocate this type of fungi in carrying microbiology of quality pollen parties and it's recommended also to bring this procedure used into the state normative documents.

Keywords: bee pollen, dietary supplement (BAA), microscopic fungi colony forming units (CFU), cultural and morphological characteristics of fungi of the genus *Fusarium*, toxicity.