УДК 639:616.982.17
DOI: 10.31073/vet_biotech43-18

ЯНГОЛЬ Ю.А.*, e-mail: yangol@ukr.net,
ТАРАСОВ О.А., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: ast97@ukr.net
Інститут ветеринарної медицини НААН

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ТЕМПЕРАТУРИ НА НАКОПИЧЕННЯ ФУМОНІЗИНУ В1, ЩО ПРОДУКУЄ *F. MONILIFORME* В ЗЕРНІ КУКУРУДЗИ

У статті представлені результати визначення оптимальних умов продукування мікотоксину фумонізину мікроскопічним грибом Fusarium moniliforme в зерні кукурудзи.

За результатами досліджень встановлено, що найбільше накопичення фумонізину В1 спостерігається за температури 25°С і сягає значення 2660,80±20,0 мкг/г через 28 діб, із подальшим збільшенням вмісту до 3877,00±20,51 мкг/г зерна на 70 добу (період спостереження).

Накопичення вмісту фумонізину В1 характеризувалося прямою кореляцією із часом спостереження. При цьому швидкість росту колоній знаходилась у прямій кореляції із часом спостереження, при цьому найвища статистична достовірність реєструвалась на 28 (r=0,951, p< 0,001) та 42 (r=0,822, p<0,001) добу експерименту. Втрата маси зерна з часом за нашими розрахунками була недостовірною.

Ключові слова: *Fusarium, фумонізин, токсигенність, зерно кукурудзи, контамінація.*

Вступ. В усьому світи забезпечення якості зернової продукції є важливим напрямом продуктової безпеки тварин та населення, оскільки ріст та розвиток токсинпродукуючих видів грибів в зерні викликає накопичення токсинів, які призводять як до важких мікотоксикозів серед тварин, так і до отруєнь серед людей. Важливість проблеми обумовлюється важкістю визначення ризиків у зв’язку із кліматичними змінами, що відбуваються протягом останнього десятиріччя [1, 2].

Мікроскопічні гриби роду *Fusarium,* які є основними токсинпродукуючими видами для зерна кукурудзи, представляють особливий інтерес, оскільки кукурудза є однією із основних культур, що використовується у виробництві кормів для тварин [3–5].

Навіть невисокі рівні контамінації токсинами зернових негативно впливають на продуктивність тварин та їх репродуктивні функції [6–8].

Кліматичні зміни, які супроводжуються значним потеплінням та змінами в складі мікробіоценозу мікроскопічних грибів та актиноміцетів, сприяють

* Аспірант

розвитку окремих таксономічних груп, основними з яких для зерна кукурудзи є представники роду фузаріум [9–13].

Дослідження накопичення токсинів за різних умов зберігання зерна є важливим для оцінки накопичення токсинів та переважання токсинпродукуючих варіантів над не токсинпродукуючими [14].

Для визначення рівнів мікотоксинів в зерновій продукції сьогодні використовують широкий спектр мікотоксикологічних, молекулярно-біологічних, хроматографічних та серологічних методів [4, 8, 11, 15].

Оскільки питання профілактики мікотоксикозів є важливим для ветеринарної та гуманної медицини, дослідження накопичення мікотоксинів, що виробляють гриби роду *Fusarium*, є важливим заходом для попередження контамінації зерна мікотоксинами у процесі зберігання.

Метою роботи було визначення впливу температури на накопичення мікотоксинів, які продукує гриб *F. moniliforme Sheldon №3* в зерні кукурудзи.

Матеріали та методи досліджень. Для проведення досліджень використовували музейний токсинпродукуючий штам *Fusarium moniliforme Sheldon №3,* що зберігається в колекції ІВМ НААН та зразки неконтамінованого грибами зерна кукурудзи, отриманої з одного із господарств Київської області.

Виділення мікроскопічних грибів та підтвердження виду проводили із використанням загальноприйнятих мікробіологічних методів із застосуванням поживних середовищ Чапека та Сабуро, які готували згідно з рекомендаціями виробника (HiMedia, Індія).

Для контамінації зерна використовували двотижневу культуру *F. moniliforme Sheldon №3,* яку вирощували на чашках Петрі з агаром Чапека. Культуру змивали фізіологічним розчином та розводили до концентрації 500,0 тис діаспор/см^3. Для контамінації зерна використовували 0,1 см^3 на 1 г зерна. Контаміноване зерно розкладали в чашки Петрі, інкубували в термостаті за температурних режимів, що були обумовлені дизайном експерименту. Додатково робили посіви методом розкладки окремих зерен на поживні середовища в чашках Петрі. Посіви інкубували за температури 24,0±2,0°С протягом 14 діб, після чого проводили підрахунки колоній та ідентифікацію до виду для виявлення сторонньої контамінації.

Наявність та концентрацію мікотоксинів в зразках зерна визначали методом імуноферментного аналізу (ІФА) за допомогою тест-систем R5602 RIDASCREEN®FAST Fumonisin (R-Biopharm-AG, Germany) згідно з інструкцією виробника на рідері для імуноферментного аналізу BioRad (λ=450 нм) та методом тонкошарової хроматографії за стандартним протоколом.

Дослід проводили протягом 70 діб за температури 15°С, 25°С, 32°С, при цьому показники (вміст фумонізину, ріст колоній та втрату маси зерна) враховували на 1, 14, 28, 42, 56 та 70 добу від початку досліду.

Отримані дані аналізували за допомогою дисперсійного аналізу (ANOVA) для визначення відсотка варіації, зумовленої дослідженими факторами. Статистичну значущість відмінностей у виміряних даних оцінювали шляхом порівняння середніх значень з використанням тесту найменшої значущої різниці. Отримані дані обробляли методом визначення головних компонент (PCA). Для визначення кореляційних зав'язків між виміряними параметрами також розраховували коефіцієнт кореляції Пірсона. Всі статистичні аналізи проводили з використанням програмного пакету «R-studio» (https://www.r-project.org/).

Результати досліджень та їх обговорення. За результатами проведеного дослідження зразка зерна кукурудзи було виявлено та ідентифіковано зміни, характерні для ураження грибами роду *Fuzarium*, при цьому за всіх досліджених температур спостерігали накопичення фумонізину В1, візуальний ріст колоній гриба та втрату маси зерна.

Результати представлені в таблиці 1.

За результатами досліджень встановлено, що найбільше накопичення фумонізину В1 спостерігається за температури 25°С і сягає значення 2660,80±20,0 мкг/г через 28 діб, із подальшим збільшенням вмісту до 3877,00±20,51 мкг/г зерна на 70 добу (період спостереження). За температури 15°С та 32°С накопичення проходить значно повільніше, сягаючи значень, відповідно, 768,60±13,03 мкг/г та 2754,40±70,67 мкг/г на 70 добу експерименту. Швидкість росту колоній також була максимальною за температури 25°С і складала 3,08±0,2 мм/добу через 42 доби, поступово знижуючись до 1,78±0,23 мм/добу на 70 добу досліду, що супроводжувалось втратою ваги зерна від 7,80±1,00% (14 доба) до 34,86±3,11% (70 доба). Температури 15°С та 32°С є менш сприятливими для накопичення токсину та росту колоній.

Накопичення вмісту фумонізину В1 характеризувалося прямою кореляцією із часом спостереження через 14 ($r=0,992$, $p<0,001$), 42($r=0,784$, $p=0,001$),56($r=0,74$,$p=0,002$) та 70($r=0,706$, $p=0,003$) діб. При цьому швидкість росту колоній знаходилась у прямій кореляції із часом культивування, при цьому найвища статистична достовірність реєструвалась на 28 ($r=0,951$, $p< 0,001$) та 42 ($r=0,822$, $p<0,001$) добу експерименту. Втрата маси зерна з часом за нашими розрахунками була недостовірною.

Таблиця 1

Результати вивчення основних параметрів оцінки зерна кукурудзи за контамінації *F. moniliforme Sheldon № 3*

Параметр	Температура культивування	Термін спостереження, діб					
		1	14	28	42	56	70
Вміст фумонізину В1, (мкг/г)	15°С	0,00 ± 0,00	2,24 ± 0,22	276,60 ± 21,80	368,00 ± 20,0	653,00 ± 19,48	768,60 ± 13,03
	25°С	0,00 ± 0,00	12,16 ± 0,46	1256,80 ± 32,52	2660,80 ± 20,0	3264,40 ± 29,35	3877,00 ± 20,51
	32°С	0,00 ± 0,00	16,66 ± 0,35	62,96 ± 4,32	2083,80 ± 100,0	2436,60 ± 19,89	2754,40 ± 70,67
Втрата маси зерна (%)	15°С	0,00 ± 0,00	2,98 ± 0,58	8,78 ± 0,70	14,02 ± 0,3	24,02 ± 1,68	23,52 ± 0,90
	25°С	0,00 ± 0,00	7,80 ± 1,00	16,18 ± 0,60	26.62 ± 0,7	34,02 ± 1,68	34,86 ± 3,11
	32°С	0,00 ± 0,00	1,80 ± 0,07	5,98 ± 0,55	13.94 ± 0,6	19,28 ± 0,90	24,22 ± 1,29
Швидкість росту колоній (мм/доба)	15°С	0,00 ± 0,00	0,50 ± 0,12	1,08 ± 0,08	1,86 ± 0,05	1,66 ± 0,25	1,32 ± 0,08
	25°С	0,00 ± 0,00	1,16 ± 0,09	2,28 ± 0,08	3,08 ± 0,2	2,18 ± 0,16	1,78 ± 0,23
	32°С	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,20	3,74 ± 0,58	2,94 ± 0,3	1,48 ± 0,31	1,34 ± 0,11
Параметри кореляції							
Вміст фумонізину В1, (мкг/г)		–	r=0,992, p <0,001	r=-0,067, p= 0,813	r=0,784, p=0,001	r=0,74, p=0,002	r=0,706, p=0,003
Втрата маси зерна (%)		–	r=-0,083, p=0,769	r=-0,165, p= 0,556	r=0,096, p=0,735	r=-0,212, p=0,447	r=0,147, p=0,6
Швидкість росту колоній (мм/доба)		–	r=0,719, p= 0,003	r=0,951, p< 0,001	r=0,822, p<0,001	r=-0,118, p=0,674	r=0,117, p=0,678

Результати варіаційного аналізу представлені в таблиці 2.

Відповідно до отриманих результатів, температура, час спостереження та їх сукупний ефект мають статистично значущий вплив на всі досліджені параметри (вміст фумонізину В1, втрата маси зерна та швидкість росту колоній) із високим ступенем вірогідності (< 0,001).

Таблиця 2

Результати варіаційного аналізу основних параметрів оцінки зерна кукурудзи за контамінації *F. moniliforme Sheldon № 3*

Параметр	Джерело варіації	Ступені свободи	Сума квадратів	Середнє квадратів	Відсоток варіації, за параметром	F	p
Вміст фумонізину B1 (мкг/г)	Температура	2	34112418,9	17056209,5	45	10995,3	< 0,001
	Час	5	89700859,1	17940171,8	48	11565,1	< 0,001
	Температура × Час	10	26750114,1	2675011,4	7	1724,4	< 0,001
Втрата маси зерна (%)	Температура	2	1427,9	714	27	582	< 0,001
	Час	5	9666,6	1933,3	72	1575,9	< 0,001
	Температура × Час	10	453,5	45,3	2	37,0	< 0,001
Швидкість росту колоній, (мм/доба)	Температура	2	9,2	4,6	23	104,6	< 0,001
	Час	5	70,8	14,2	69	321,7	< 0,001
	Температура × Час	10	16,2	1,6	8	36,8	< 0,001

При цьому за PSA (аналізом компонент), на температуру припадає 73,8% всієї варіації, а на час – 21,7%, що підтверджує, що визначальною характеристикою, яка обумовлює накопичення фумонізина B1 в зерні кукурудзи, ймовірно є температура зберігання (рис. 1).

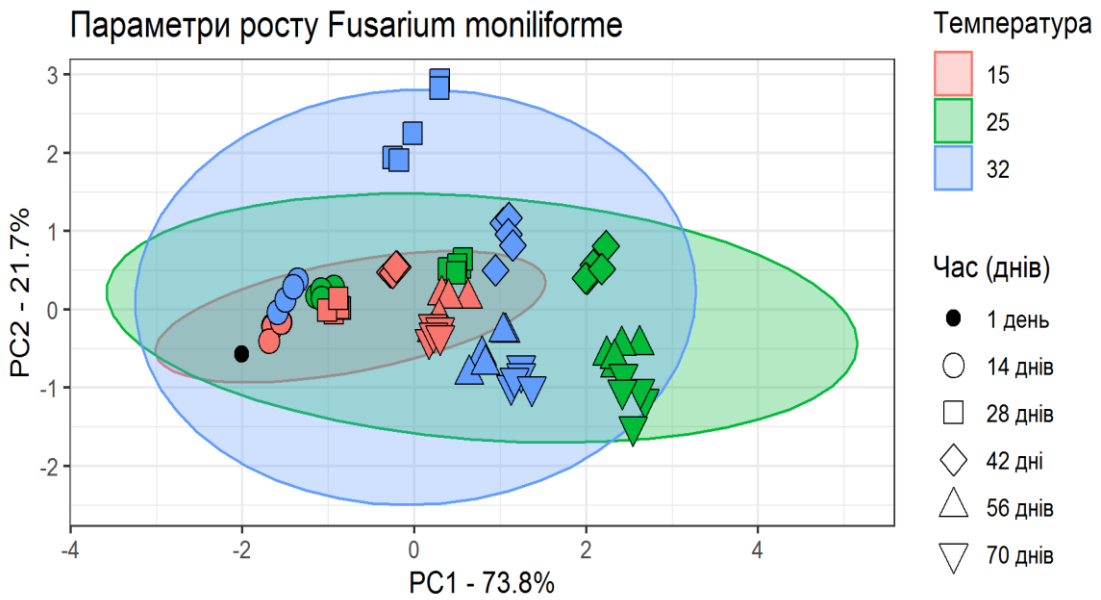

Рис. 1. Вплив температури та часу на ріст *F. moniliforme Sheldon № 3*, накопичення фумонізину та втрату ваги зерна кукурудзи.

Слід зазначити, що згідно з чинним законодавством, кількість міцелярних грибів санітарною оцінкою зерна не регламентується, а регулюються лише допустимі концентрації мікотоксинів, тому для попередження накопичення мікотоксинів в зерні, важливо дотримуватись температурного режиму зберігання для зменшення ризиків контамінації.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. За результатами досліджень встановлено, що найбільше накопичення фумонізину В1 в зерні кукурудзи відбувається за температури 25°С, сягаючи значень 2660,80±20,0 мкг/г через 28 діб, до максимального вмісту 3877,00±20,51 мкг/г зерна на 70 добу досліду.

2. Накопичення вмісту фумонізину В1 має пряму кореляцію із часом спостереження через 14 (r=0,992, p<0,001), 42 (r=0,784, p=0,001), 56 (r=0,74,p=0,002) та 70 (r=0,706, p=0,003) діб. При цьому швидкість росту колоній *F. moniliforme* знаходилась у прямій кореляції із часом спостереження, на 28 (r=0,951, p< 0,001) та 42 (r=0,822, p<0,001) добу експерименту.

Отримані дані будуть використані під час укладання методичних рекомендацій щодо профілактики фузаріотоксикозів тварин.

STUDYING THE EFFECT OF TEMPERATURE ON THE ACCUMULATION OF FUMONISIN B1 PRODUCED BY F. MONILIFORME IN MAIZE GRAIN / Yangol Y., Tarasov O.

Introduction. *Ensuring the quality of grain products is an important area of food safety for animals and the public, as the growth and development of toxin-producing fungal species in grain causes the accumulation of toxins that lead to severe mycotoxicosis in animals and poisoning in humans. The importance of the problem is due to the difficulty of determining the risks because of climate change that has been occurring over the past decade. Since the issue of mycotoxicosis prevention is important for veterinary and human medicine, the study of the accumulation of mycotoxins produced by fungi of the genus Fusarium is an important measure to prevent grain contamination with mycotoxins during storage.*

The goal of the work *was to determine the optimal conditions for the accumulation of mycotoxins produced by the fungus F. moniliforme Sheldon No. 3 in corn grain.*

Materials and methods. *The museum toxin-producing strain of Fusarium moniliforme Sheldon No. 3, stored in the collection of the Institute of Veterinary Medicine of the NAAS, and samples of corn grain free from fungi obtained from one of the farms in the Kyiv region were used for the study.*

The isolation of microscopic fungi and confirmation of the species was carried out using conventional microbiological methods using Chapek and Sabouraud nutrient media, which were prepared according to the manufacturer's recommendations (HiMedia, India).

The presence and concentration of mycotoxins in grain samples were determined by ELISA using R5602 RIDASCREEN®FAST Fumonisin test systems (R-Biopharm-AG, Germany) according

to the manufacturer's instructions on the BioRad enzyme-linked immunosorbent assay reader (λ = 450 nm) and by thin-layer chromatography according to a standard protocol.

The experiment was carried out for 70 days at 15°C, 25°C, 32°C, and the indicators (fumonisin content, colony growth, and grain weight loss) were taken into account on 1, 14, 28, 42, 56, and 70 days from the beginning of the experiment.

The data obtained were analyzed using analysis of variance (ANOVA) to determine the percentage of variation due to the studied factors.

Results of research and discussion. *The results of the study revealed and identified changes characteristic of the fungi of the genus Fuzarium, while at all tested temperatures, the accumulation of fumonisin B1, visual growth of fungal colonies and loss of grain weight were observed. According to the results of the research, it was found that the highest accumulation of fumonisin B1 was observed at a temperature of 25°C and reached a value of 2660.80±20.0 μg/g after 28 days, with a further increase in content to 3877.00±20.51 μg/g of grain on day 70 (observation period).*

The accumulation of fumonisin B1 content was characterized by a direct correlation with the observation time after 14 (r=0.992, p<0.001), 42 (r=0.784, p=0.001), 56 (r=0.74, p=0.002) and 70 (r=0.706, p=0.003) days. The growth rate of colonies was in direct correlation with the time of cultivation, with the highest statistical significance recorded on the 28th (r=0.951, p<0.001) and 42nd (r=0.822, p<0.001) day of the experiment. According to our calculations, the loss of grain weight over time was unreliable.

Conclusions and prospects for further research. *According to the results of the study, it was found that the highest accumulation of fumonisin B1 was observed at 25°C and reached a value of 2660.80±20.0 μg/g after 28 days, with a further increase in content to 3877.00±20.51 μg/g of grain on day 70 (observation period).*

The accumulation of fumonisin B1 content was characterized by a direct correlation with the observation time after 14 (r=0.992, p<0.001), 42 (r=0.784, p=0.001), 56 (r=0.74, p=0.002) and 70 (r=0.706, p=0.003) days. The growth rate of colonies was in direct correlation with the observation time, with the highest statistical significance recorded on the 28th (r=0.951, p<0.001) and 42nd (r=0.822, p<0.001) day of the experiment. According to our calculations, the loss of grain weight over time was unreliable.

The data obtained will be used to create guidelines for the prevention of Fusarium toxicosis in animals.

Keywords: *Fusarium, microscopic fungi, toxigenecity, corn feed, contamination.*

REFERENCES

1. Yu, J., & Pedroso, I.R. (2023). Mycotoxins in Cereal-Based Products and Their Impacts on the Health of Humans, Livestock Animals and Pets. *Toxins (Basel),* 15(8), 480. doi: 10.3390/toxins15080480. PMID: 37624237; PMCID: PMC10467131.

2. Penagos-Tabares, F., Khiaosa-Ard, R., Schmidt, M., Pacífico, C., Faas, J., Jenkins, T., Nagl, V., Sulyok, M., Labuda, R., & Zebeli, Q. (2022). Fungal species and mycotoxins in mouldy spots of grass and maize silages in Austria. *Mycotoxin research,* 38(2), 117-136. https://doi.org/10.1007/s12550-022-00453-3.

3. Dvorskaya, U. (2016). Mycotoksini v kormsah vliianie na givotnih [Mycotoxins in feed: impact on animals]. *Efectivny kormy ta godivlia – Effective feeds and feeding*, 2, 34-38 [in Russian].

4. Trufanov, O.V. (2011). Monitoring zagriaznennosti mycotoksinamy zerna i kormov v Ukraine v 2005-2010 godah [Monitoring of cereals and feed with mycotoxines contamination in

Ukraine in 2005-2010]. *Suchasni problemy toksikologii – Contemporary problems of toxicology*, 1-2, 55-59 [in Ukrainian].

5. Ji, F., He, D., Olaniran, A.O. et al. (2019). Occurrence, toxicity, production and detection of Fusarium mycotoxin: a review. *Food Prod Process and Nutr*., 1, 6. https://doi.org/10.1186/s43014-019-0007-2.

6. Janik, E., Niemcewicz, M., Podogrocki, M., Ceremuga, M., Gorniak, L., Stela, M., & Bijak, M. (2021). The Existing Methods and Novel Approaches in Mycotoxins' Detection. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(13), 3981. https://doi.org/10.3390/molecules26133981.

7. Weaver, A. C., Weaver, D. M., Yiannikouris, A., & Adams, N. (2022). Meta-analysis of the effects of mycotoxins and yeast cell wall extract supplementation on the performance, livability, and environmental sustainability of broiler production. *Poultry science*, 101(9), 102043. https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102043.

8. Zhang, D., Zhao, L., Chen, Y., Gao, H., Hua, Y., Yuan, X., & Yang, H. (2022). Mycotoxins in Maize Silage from China in 2019. *Toxins*, 14(4), 241. https://doi.org/10.3390/toxins140402419.

9. Chauhan, R., Singh, J., Sachdev, T., Basu, T., & Malhotra, B. D. (2016). Recent advances in mycotoxins detection. *Biosensors & Bioelectronics*, 81, 532-545. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.03.004.

10. Chen, Y., Chen, Q., Han, M., Zhou, J., Gong, L., Niu, Y., Zhang, Y., He, L., & Zhang, L. (2016). Development and optimization of a multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous determination of three mycotoxins in corn, rice and peanut. *Food Chemistry*, 213, 478-484. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.116.

11. Awuchi, C.G., Ondari, E.N., Nwozo, S., Odongo, G.A., Eseoghene, I.J., Twinomuhwezi H., Ogbonna, C.U., Upadhyay, A.K., Adeleye, A.O., Okpala, C.O.R. (2022). Mycotoxins' Toxicological Mechanisms Involving Humans, Livestock and Their Associated Health Concerns: A Review. *Toxins (Basel)*, 14(3):167. doi: 10.3390/toxins14030167.

12. Kępińska-Pacelik, J., & Biel, W. (2021). Alimentary Risk of Mycotoxins for Humans and Animals. *Toxins*, 13(11), 822. https://doi.org/10.3390/toxins13110822

13. Anfossi, L., Giovannoli, C., & Baggiani, C. (2016). Mycotoxin detection. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 120-126. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.11.005.

14. Nan, M., Xue, H., & Bi, Y. (2022). Contamination, Detection and Control of Mycotoxins in Fruits and Vegetables. Toxins, 14(5), 309. https://doi.org/10.3390/toxins14050309.

15. Locatelli, S., Scarpino, V., Lanzanova, C., Romano, E., & Reyneri, A. (2022). Multi-Mycotoxin Long-Term Monitoring Survey on North-Italian Maize over an 11-Year Period (2011-2021): The Co-Occurrence of Regulated, Masked and Emerging Mycotoxins and Fungal Metabolites. *Toxins*, 14(8), 520. https://doi.org/10.3390/toxins14080520.