

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ПОЛІСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет ветеринарної медицини
Кафедра мікробіології, фармакології та епізоотології

Кваліфікаційна робота
на правах рукопису

Гуменюк Наталія В'ячеславівна

УДК 638.178.2:57.013:579.62

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**Ідентифікація окремих видів мікроскопічних грибів –
контамінантів бджолиного обніжжя
(зігоміцети порядку Mucorales)**

**The Identification of Certain Species Microscopic Fungi –
Contaminants in Bee Pollen Load
(Zygomycetes of Order Mucorales)**

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.

Гуменюк Н.В.

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

АНОТАЦІЯ

Гуменюк Н.В. Ідентифікація окремих видів мікроскопічних грибів – контамінантів бджолиного обніжжя (зигоміцети порядку Mucorales) – Кваліфікаційна робота на правах рукопису.

Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня магістра за спеціальністю 211 – ветеринарна медицина. – Поліський національний університет, Житомир, 2021.

Зміст анотації. Представлено результати мікологічних та мікроскопічних досліджень зразків бджолиного обніжжя з 4-х областей України. З метою обрахунку кількості мікроскопічних грибів пропонується використовувати агар Чапека, для виділення чистих культур мукоральних грибів – агар Сабуро. Ідентифіковано такі види грибів-контамінантів з класу зигоміцетів як *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus megalosporus*, *Rhizopus microsporus*, *Mucor hiemalis*, *Mucor racemosus*.

Ключові слова: бджолине обніжжя, мікроскопічні гриби, зигоміцети, культуральні ознаки колоній, морфологічні ознаки ізолятів.

SUMMARY

Gumenyuk N.V. – The Identification of Certain Species Microscopic Fungi – Contaminants in Bee Pollen Load (Zygomycetes of Order Mucorales) – Manuscript qualification work.

Qualification work for the master's degree in specialty 211 – veterinary medicine. – Poleski National University, Zhytomyr, 2021.

Contents of the abstract. The results of microbiological researches of bee pollen from 4 regions of Ukraine are presented. In order to determine number of microscopic fungi, it is proposed to use Czapek agar, in order to isolate pure cultures – Sabouraud agar. The structure of zygomycetes of bee pollen was studied, as well as the dominant species of it. They are *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus megalosporus*, *Rhizopus microsporus*, *Mucor hiemalis*, *Mucor racemosus*.

Key words: bee pollen, microscopic fungi, zygomycetes, cultural characteristics of colonies, morphological features of isolates.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1 Систематичне положення та поширення грибів класу зигоміцетів.....	8
1.2 Морфо-фізіологічні ознаки грибів порядку Mucorales	10
Висновки до розділу 1.....	14
РОЗДІЛ 2 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	16
2.1 Матеріали і методи досліджень	16
2.2 Характеристика місця виконання роботи.....	19
2.3 Результати власних досліджень.....	20
Висновки до розділу 2.....	28
РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	29
Висновки до розділу 3.....	31
ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ	32
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	33
ДОДАТКИ.....	37
Додаток А Хронологія опису грибів родів Mucor та Rhizopus.....	37

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

АС – агар Сабуро

АЧ – агар Чапека

БАД – біологічно активна добавка

БАП – біологічно активний продукт

ДСТУ – Державний стандарт України

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

КУО – колонієутворюючі одиниці, кількість зародків грибів (спорангіоспор, конідій, вегетативних спор чи шматків гіфи) в 1 г зразка.

ВСТУП

Актуальність теми дослідження. Обніжжя – це квітковий пилок, клітини якого виділені генеративними частинами рослин, зібрані бджолами і, після додавання нектару та речовин із слинних залоз комах, оформлені ними в кульки неправильної форми. Правильно виготовлене та висушене до 5-10% вологості обніжжя містить понад 250 корисних компонентів. Ця біологічно активна добавка (БАД) містить моноцукри, мононенасичені та поліненасичені жирні кислоти, вітаміни E, C, B1, B6, B12 та PP, макро- і мікроелементи (калій, кальцій, магній, ферум, цинк, купрум, кобальт, фосфор, манган, сульфур, аргентум, нікель, натрій, хлор), незамінні амінокислоти, ліпіди, до 50 ензимів, фітостерини, фенольні сполуки (катехіни, флавоноїди, антоціани, лейкоантоціани, аурони, халкони і фенолокислоти), фітогормони (брасини). Додавання до обніжжя речовин із секрету щелепових залоз бджіл (10-гідрокси-2-деценова кислота, яка перешкоджає проростанню пилка та сполук з антибіотичними властивостями) дозволяє віднести цей продукт до речовин не лише рослинного походження.

Продукти бджільництва та композиції, виготовлені на їх основі, належать до парафармацевтиків, тобто речовин, рекомендованих не для лікування, а для профілактики захворювань. Амінокислоти та жирні кислоти обніжжя допомагають у регенерації клітин, білки чинять адаптогенну дію, флавоноїди – антибіотичну, а їх похідні (рутин, кверцетин) – впливають на роботу капілярів, іони феруму, кобальту та купруму – стимулюють еритро- і лейкопоез. Тому обніжжя призначають при фізичному та розумовому виснаженні, синдромі хронічної втоми, хворобах дихальних шляхів, при очищенні організму від токсинів та шлаків. Лікарі-дієтологи вважають, що оптимальна добова доза обніжжя складає 50–100 г, а його непереносимість у вигляді різноманітних алергічних реакцій реєструється лише у 1–5 % людей.

Оскільки будь-який зразок обніжжя є нестерильним, в ньому завжди присутня певна кількість сапрофітних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Їх активний ріст і розвиток стримує низька вологість, але при її збільшенні до

15% якість та безпека БАД може погіршитись. Найчастіше мікробіологічні показники обніжжя, виготовленого в різних країнах, відхиляються від норми через наявність в ньому великої кількості зародків мікроміцетів (міцеліальних грибів). Саме представники даної підгрупи мікроорганізмів здатні розвиватись при 12% вологості, і багато з них за певних обставин виділяють такі шкідливі вторинні метаболіти як мікотоксини.

Мета і завдання роботи. Ідентифікація грибів з певних родів, які систематично належать до порядку мукорові класу зигоміцетів – потенційних продуцентів мікотоксинів, наявних в зразках українського бджолиного обніжжя.

Предмет та об'єкт дослідження. Предметом дослідження є зразки обніжжя, виготовлені на приватних пасіках центральної та західної частини України, об'єктом – міцеліальні гриби класу зигоміцетів (окремі роди порядку Mucorales), наявні в даному біологічно активному продукті (БАП).

Методи дослідження. В роботі використовували:

- мікологічні дослідження (вирощування накопичувальних та чистих культур грибів);
- статистичні дослідження (обробка результатів кількісних висівів);
- мікроскопічні дослідження живих та фарбованих препаратів грибів, отриманих із матеріалу чистих культур (проведення видової ідентифікації для виявлення можливих продуцентів мікотоксинів).

Перелік публікацій автора. 1. Васіковський М.В., Мельник Н.В., Солодка Л.О., Кривда М.І. Виявлення умовно-патогенних бактерій в кормах для тварин. *Наукові здобутки студентської молоді у ветеринарії: матеріали науково-практичної конференції магістрів та бакалаврів (31 січня 2019 р.)*. Житомир, 2019. Вип.№10.С. 64-67.

2. Солодка Л.О., Ковальов П.В., Мельник Н.В. Визначення мікробного числа повітря в приміщеннях навчально-науково-виробничої клініки ветеринарної медицини ЖНАЕУ. *Наук. читання 2020. Сучасні підходи забезпечення здоров'я тварин та якості кормів і харчових продуктів:*

матеріали 6-ї наук.-практ. конференції (листопад-січень 2019-2020 р.р.).
Житомир, 2020. С. 197-199.

3. Гуменюк Н.В. Особливості росту типових контамінантів бджолиного обніжжя (гриби класу Зигоміцетів) на загальних поживних середовищах. *Наукові здобутки студентської молоді у ветеринарії: матеріали XXII-ї всеукраїнської науково-практичної конференції магістрів та бакалаврів (22 січня 2021 р.).* Житомир, 2021. Вип.№12. С.167-170.

Практичне значення отриманих результатів. Видова ідентифікація грибів певних родів допоможе спеціалістам токсикологічних або імунологічних відділів галузевих діагностичних лабораторій швидше виявляти імовірні групи (види) токсинів, продуцентами яких є дані мікроорганізми.

Структура та обсяг роботи. Дипломна робота включає всі розділи, зазначені в «Методичних порадах до написання кваліфікаційної роботи для студентів спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» ОС «Магістр». Написана на 39 сторінках, містить 3 таблиці, 15 рисунків, 41 посилання на бібліографічні джерела та електронні ресурси, серед яких 12 англomовних.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Систематичне положення та поширення грибів класу зигоміцетів

Одною з еволюційних гілок домену «Еукаріоти» є представники морфологічної групи «Гриби». В теперішній час описано приблизно 100 видів із даної гетерогенної групи, але за прогнозами спеціалістів-мікологів реальна кількість видів на Землі має сягати від 300 тисяч до 1,5 мільйонів [1,2]. Систематизацією грибів як біологічних організмів традиційно займалися ботаніки. Лише наприкінці 60-х років 20 ст., за пропозицією видатного світового еколога – американця Роберта Гардінга Віттекера, гриби віднесли до окремого царства, яке зараз розділяють на 3 великі підгрупи [3].

«Грибоподібними організмами» називаються слизовики (підцарства акразіо-, міксо- та плазмодіофоромікота) та псевдогриби (лабірінтуло-, гіфотрихіо- та оомікота). До підгрупи «справжні гриби» належать представники підцарств аско-, хітрідіо-, базидіо- та зигомікота (табл.1.1). Несистематизованими лишаються представники формального класу дейтеромицетів (до нього належать і самостійні роди, і роди з інших класів) та лишайники, які ще називають «ліхенізованими грибами».

Таблиця 1.1

Систематика представників морфологічної групи «Гриби»

Одиниця систематики	Назви таксономічних підрозділів			
Домен	Еукаріоти			
Царство	Mycota			
Підцарство	Fungi			
Відділи	Ascomycota	Chitridiomycota	Basidiomycota	Zigomycota
Класи/ окремі роди	Ascomycetes (6400 родів) р.р. Sordaria, Neurospora, Trichoderma, Monilinia, Sclerotinia, Aspergillus, Fusarium, Penicillium тощо	Chitridiomycetes (120 родів). р.р. Allomyces, Blastocladiella, Olpidium, Monoblefaris, Synchytrium, Pythium, Phytophthora тощо	Basidiomycetes (1590 родів) р.р. Ramaria, Poria, Sparassis, Cantarellus, Agaricus, Fomes, Boletus, Suillus, Amantia, Leccinum, Psilocybe тощо	Zigomycetes (100 родів) р.р. Mucor, Rhizopus, Absidia, Mortierella, Zygorhynchus, Thamnidium, Rhopalomyces тощо

Ще у 80-х роках 20 ст. клас зигоміцети розділяли на 2 порядки: мукорові (роди *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Mortierella*, *Zygorhynchus* тощо) та ендогонові (роди *Glomus*, *Gigaspora*, *Endogone*, *Sclerocystis*). Аналіз геному грибів призвів до певних змін в систематиці як царства *Mycota*, так і даного відділу. Наприклад, симбіонтів мікориз рослин (р. *Glomus* тощо) було вилучено з класу зигоміцетів і внесено в новостворений відділ підцарства *Fungi* – *Glomeromycota* (гломеромікота). В 2007 р. рядом провідних мікологів із США, Німеччини, Великої Британії та Китаю взагалі було запропоновано вважати зигоміцетів ще недостатньо систематизованою групою грибів, з якої в майбутньому буде виділено нові систематичні одиниці [4].

Але ніхто не сумнівається в тому, що представники 13-ти родин порядку *Mucorales* є найчисельнішим серед зигоміцетів (55 родів) [5,6]. До інших 5-ти порядків даного класу включено загалом 45 родів грибів, більшість з яких є паразитами нематод, амеб, личинок комах або інших зигоміцетів.

Перші представники *Mucorales* були описані в 1789 р. німецьким натуралістом, зоологом та мікологом Ф. Шранком (*Mucor albus*), останні – виділені в 2019 р. при аналізі 100 музейних мікробіологічних зразків, наданих *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute* (The Netherlands), *Jena Microbial Resource Collection* (Germany), інститутом *Carlos III National Centre for Microbiology* (Spain) та Бельгійською колекцією мікроорганізмів (*Mucor atramentarius*, *Mucor amethystinus*, *Mucor pseudolusitanicus*, *Mucor variicolumellatus*, *Mucor pseudocircinelloides*). Наприкінці 2019 р. в базі даних щодо мікологічної номенклатури (Індекс назв грибів або *Species Fungorum*) було зареєстровано 100 видів лише роду *Mucor*, 36 з яких було ідентифіковано впродовж останніх 20 років (Додаток А) [7].

Мукорові гриби поширені в ґрунті, де приймають участь у мінералізації органічних речовин. Розвиваються за присутності органічного нітрогену та вуглеводів (як моно-, так і поліцукрів). Широко використовуються в біотехнології як продуценти ферментів, кислот, спирту та макролідного антибіотику роваміцину (*Mucor rammianus*), в азійській кухні – для

виготовлення соєвого соусу, сиру та інших продуктів (*Mucor sinensis*, *Mucor racemosus*, *Mucor circinelloides*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus japonicus*, *Rhizopus oligosporus*) [8]

Розвиток грибів даних родів (*Mucor circinelloides*, *Mucor hiemalis*, *Rhizopus microsporus* тощо) є причиною псування ряду харчових продуктів (картопля, цукровий буряк, баклажани, груші, яблука, персики, виноград, інжир, ягоди ожини, суниці, полуниці, малини), кормів (сіно, солома, кукурудза, комбікорми), гниття коренів та квіток [1, 9].

Деякі представники порядку *Mucorales* (роди *Mucor*, *Rhizopus*, *Lichtheimia*, *Arrophysomyces*) можуть стати причиною поверхневих та вісцеральних мукомікозів (шкірні інфекції, захворювання легенів, ураження шлунково-кишкового тракту). Захворювання розвивається у свійських, сільськогосподарських, хутрових, зоопаркових тварин та людини незалежно від пори року, але найчастіше – в теплу пору року при підвищеній вологості повітря. У людини виникнення мукомікозу провокують тимчасові або стійкі імунодефіцити після терапії онкологічних захворювань, трансплантації органів, тривалого прийому стероїдних препаратів, діабету, розвиток якого не контролюється лікарями [10-13].

1.2 Морфо-фізіологічні ознаки грибів порядку *Mucorales*

Основною морфологічною структурою будь-якого гриба є нитковидна гіфа, з переплетення багатьох гіф утворюється грибний міцелій. При штучному культивуванні в лабораторії, в залежності від умов вирощування, складу поживного середовища, типу культури та методики висіву міцелій може представляти собою окрему колонію чи штрих, а також плівку різної висоти та щільності («суцільний газон», «рідкий газон»).

Швидкість росту міцелію у різних видів грибів відрізняється. Короткий час генерації мають представники тих родів чи порядків, у яких інтенсивно утворюються речовини клітинної стінки верхньої (апикальної) частини гіфи.

Представники мукоральних грибів належать саме до таких, і тому швидко розростаються на поверхні підходящих для них субстратів [1, 6, 14, 15].

При спостереженні за ростом молодих грибних колоній звертають увагу на особливості будови гіф, характер їх гілкування та розміщення по відношенню до центру колонії, розподіл між субстратними та повітряними гіфами. На початкових стадіях розвитку колоній розгалужуватись можуть верхівки гіф (дихотомічне гілкування) або їх бічні гілки (моно- чи симподіальне) (рис. 1.1).

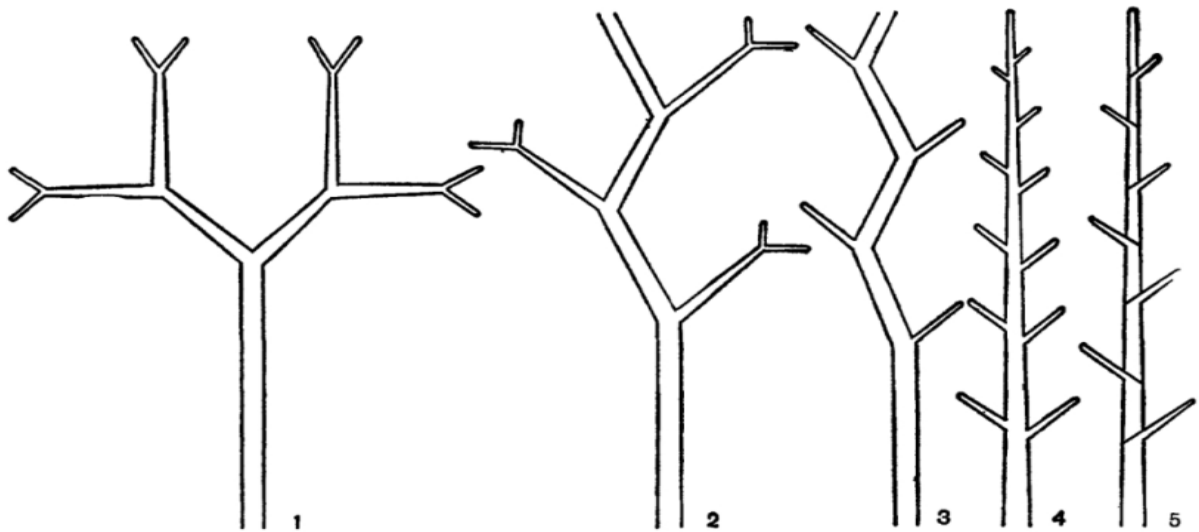


Рис.1.1 Варіанти гілкування:

1- рівне дихотомічне; 2 – нерівне дихотомічне; 3 – дихоподіальне;
4 – моноподіальне; 5 – симподіальне.

Вивчення росту молодих колоній за допомогою лупи дозволяє помітити, що навіть при моноподіальному гілкуванні, гіфи краю колоній можуть бути простими або мати перетинки чи пряжки (рис.1.2).

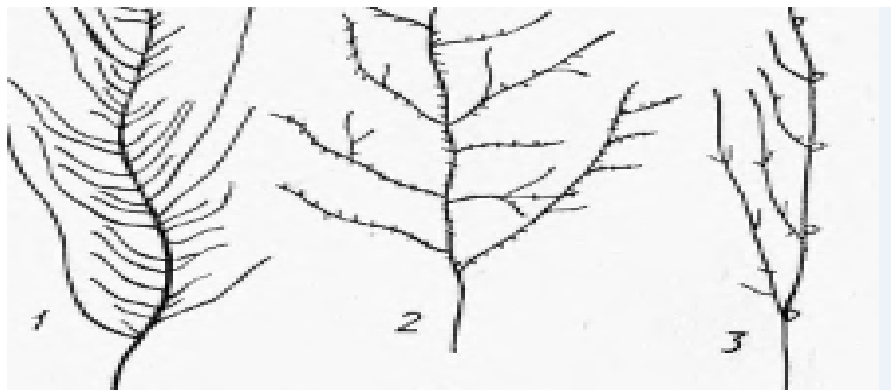


Рис. 1.2 Вигляд гіф з краю колонії при моноподіальному гілкуванні:

1 – просте ; 2 – з перетинками; 3 – з пряжками

Загальновідомо, що колонії мукових грибів мають гарно розвинений одноклітинний (ценоцитний) міцелій, який поширюється, в основному, по поверхні поживного середовища. Цей повітряний міцелій може направляти всередину субстрату більш-менш розвинені вирости (ризоїди); всередині нього утворюються дугоподібні гіфи (столони); репродуктивними органами є спорангії, які містять ендогенні спорангіоспори (кулястої, еліптичної, паличкоподібної чи яйцевидної форми). При рості спорангію його верхівка має вигляд кулястого чи грушоподібного стовпчику (колумела), а розширена нижня частина спорангію часто утворює апофізу (рис.1.3). Саме за формою спор та колумели, виглядом ризоїдів та спорангіюму, наявністю апофізи, кольором міцелію здійснюють ідентифікацію видів порядку мукові.

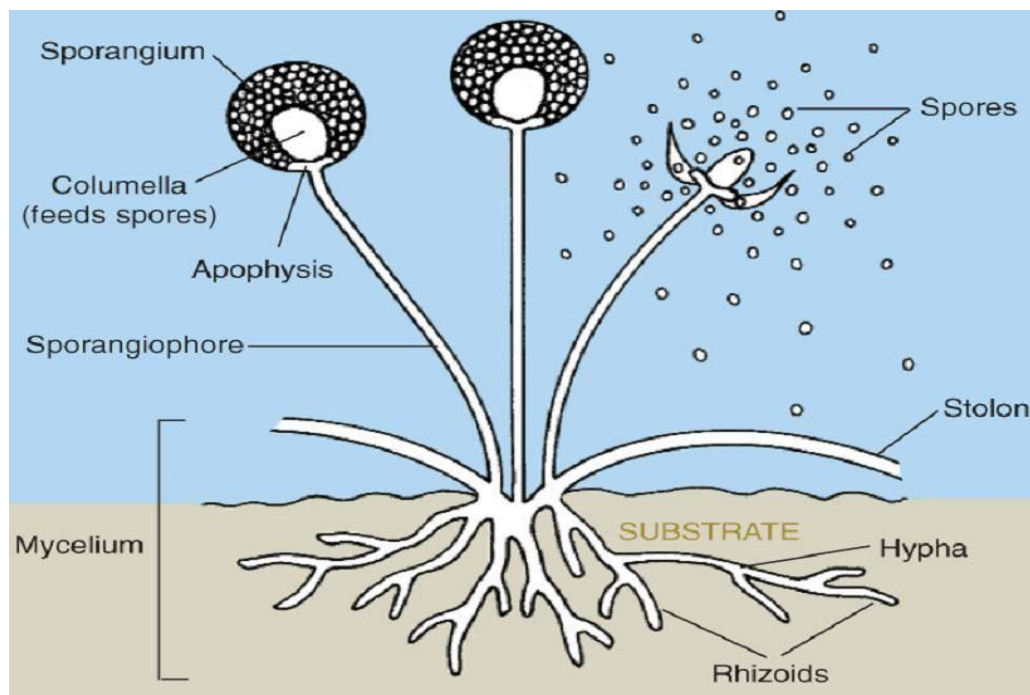


Рис.1.3 Вегетативні та репродуктивні структури грибів порядку *Mucorales*.

Характерними структурами мукоральних грибів є клітини, утворені в зрілих культурах під час фрагментації гіф і призначені для вегетативного розмноження. Такими є овальні чи циліндричні оїдії та артроспори, в старих культурах – товстостінні хламідоспори. Останні можуть бути не лише поодинокими, але й розміщеними у групах як на верхівці гіфи, так і з боків (інтеркалярно). Особливими морфологічними утвореннями грибів класу

Zigomycetes є статеві гаметангії-зигоспори, які і дали назву даному відділу (рис.1.4).

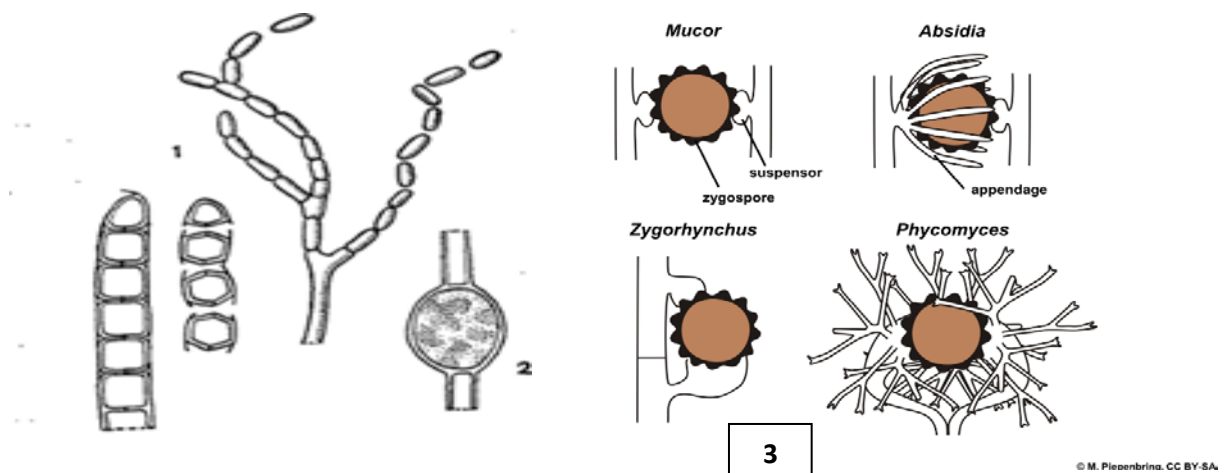


Рис.1.4 Вегетативні та статеві спори зигоміцетів:

1 – артроспори; 2 – хламідоспори; 3 – зигоспори грибів різних родів

Генетичні ознаки представників даної морфологічної групи дозволяють їм розвиватись в умовах низької вологості та широкого інтервалу кислотності (рН=1,4–8,8). Під час життєдіяльності грибні клітини синтезують ряд вторинних метаболітів: поліпептиди, поліцукри, органічні кислоти, похідні фенолів та хінонів, глюкозиди, стероли, ізопреноїди, гетероциклічні сполуки. Частина з них є ферментами (протеази, амілази, ліпази, целюлози), інші виявляють антибіотичну або токсичну дію. Віднести вторинний метаболіт до групи антибіотиків чи токсинів іноді дуже важко. Прояв такої дії залежить від спектру мікроорганізмів в природній чи штучній системі, умов існування наявних асоціацій [2,15-18]. Але положення про те, що значна кількість метаболітів не ферментативної природи по відношенню до тварин можуть бути зоотоксинами з канцерогенними, алергенними, імуносупресорними чи тератогенними властивостями вже не викликає сумніву. Саме тому в лікарській практиці чи для захисту рослин застосовують лише триходермін, трихотецин, гризеофульвін та мікофенолову кислоту.

Інформація щодо токсичності грибів порядку мукорові з'явилась в науковій літературі ще в середині 40-х років 20 ст., в працях видатного українського міколога Підопличко М.М. [19]. Інтенсивне обсіменіння біологічного матеріалу муковорими грибами було виявлено при вивченні мікобіоти зернових культур, залишених взимку в полі; зерна та комбікормів при їх неналежному складському зберіганні [20]. При згодовуванні морським свинкам та кролям кормів, контамінованих грибами родів *Mucor* та *Mortierella*, загибель тварин спостерігали через 3-26 діб від початку експерименту. В шкірних тестах на кролях було продемонстровано токсичність водних та ефірних екстрактів цих грибів (реакція – від незначного почервоніння шкіри до глибокого некрозу).

В подальшому здатність до токсиноутворення була виявлена у 15 видів зигоміцетів – *Absidia glauca*, *Actinomucor elegans*, *Cunninghamella elegans*, *Helicostylum piriforme*, *Mortierella isabellina*, *Mortierella (Mucor) rammaniana*, *Mucor hiemalis*, *Mucor mucedo*, *Mucor spinosus*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus stolonifer*, *Syncephalastrum racemosum*, *Thamnidium elegans*, *Zygorhynchus moelleri* [21-23]. Токсичність екстрактів, виготовлених з культур роду *Mucor*, реєструється по відношенню до різних біологічних об'єктів (*Mucor mucedo* – креветки, курячі ембріони; *Mucor indicus* та *Mucor circinelloides* – каченята). Встановлено, що культури *Mucor mucedo* при розвитку на харчових продуктах здатні виділяти афлатоксин, які викликають рак печінки, порушення сечовиділення, кровотворення тощо, аналогічно токсинам аспергилів.

Висновки до розділу 1

Представники порядку *Mucorales*, в значній кількості видів, широко представлені в природних системах (грунт, поверхня рослин та їх пілок, повітря, корми, харчові продукти). Незважаючи на те, що перші представники групи охарактеризовані майже 200 років тому, систематизація, відкриття нових

видів, вивчення особливостей їх фізіології продовжується й досі. Загальновідомо, що мукоральні гриби здатні викликати таку хворобу як мукоромікоз у певних груп населення (онкохворі, діабетики, післяопераційні пацієнти тощо). Тому, через природне обсіменіння значною кількістю грибів, такий вид БАД як бджолине обніжжя, цим особам призначати недоцільно.

За певних умов зберігання харчових продуктів та біодобавок, мукоральні гриби можуть виділяти небезпечні токсини. Але повноцінне вивчення даного феномену ще попереду, оскільки в теперішній час швидкість відкриття нових токсинів (відомо майже 500 подібних сполук) значно випереджає:

— можливість їх діагностики в кормах, харчових продуктах, спеціях та біодобавках (нормується і може бути визначено лабораторно всього 15 видів токсинів);

— ефективні способи боротьби з ними (неможливо підібрати універсальні сорбенти чи антидоти, придатні для знешкодження/елімінації всіх груп мікотоксинів);

— створення бази даних для співставлення наборів токсинів з наявністю тих чи інших видів грибів в мікробній асоціації (потребує об'єднання зусиль мікологів, токсикологів, біоінформатиків, лікарів гуманної та ветеринарної медицини, тваринників і тому є дуже дорогим проектом для сучасної фундаментальної та практичної науки).

2. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали і методи досліджень

Схему дослідження зразків обніжжя, проведену задля виділення та ідентифікації грибів певних видів, наведено на рисунку 2.5.

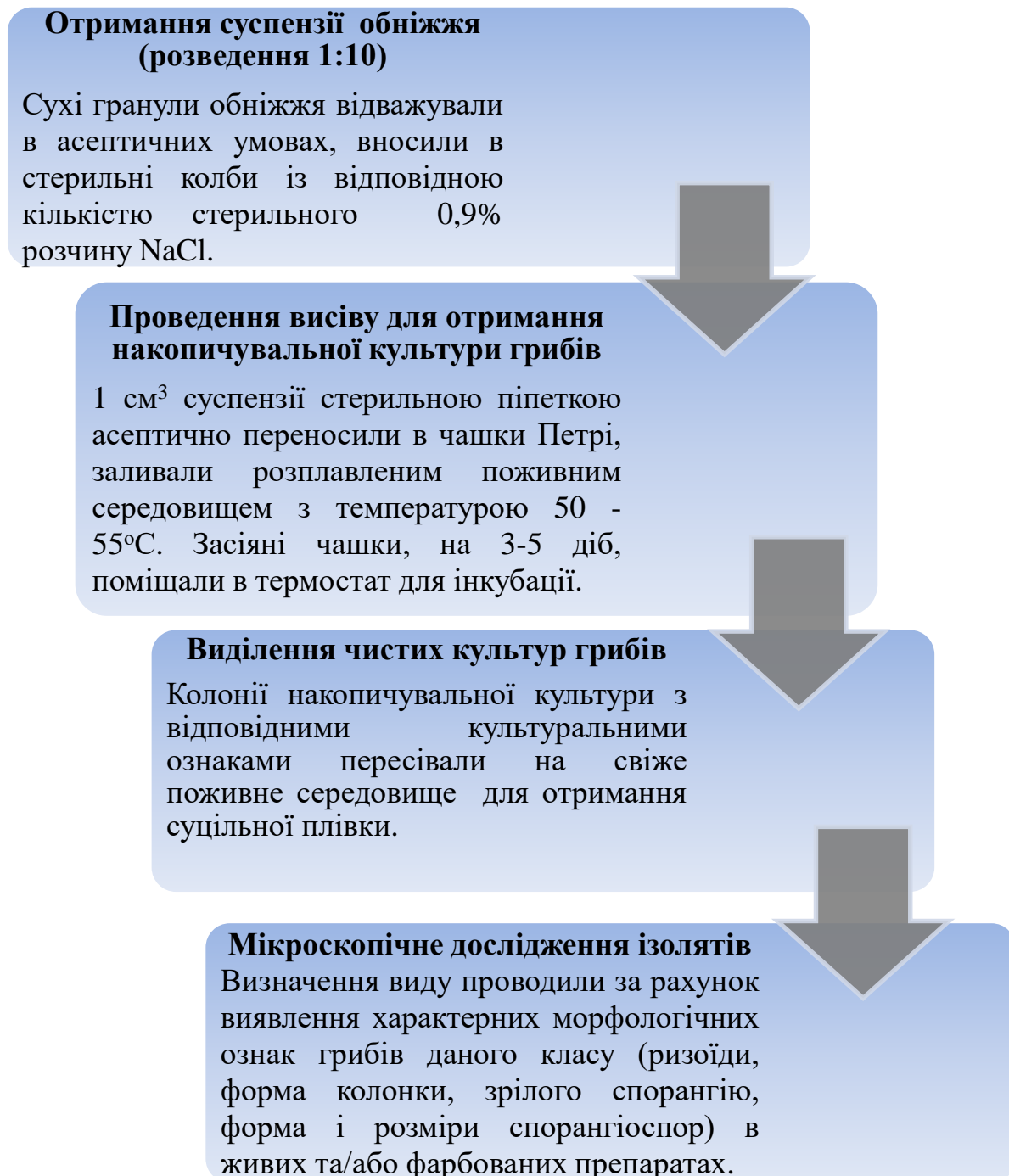


Рис. 2.5 Етапи мікологічного дослідження

Накопичувальні та чисті культури мукоральних грибів вирощували на стандартних середовищах загального призначення – агарах Чапека і Сабуро

(АЧ і АС), порівняльна характеристика яких представлена в таблиці 2.2. Дані середовища рекомендовані Фармакопеею США для проведення тестів на наявність грибів [24-26]. Через 36-72 год. культивування на них інтенсивно розвиваються референс-штами грибів (*Aspergillus niger* 16404, *Candida albicans* 10231, *Saccharomyces cerevisiae* 9763).

Таблиця 2.2

Порівняльна характеристика агарових поживних середовищ

Характеристики середовища	Поживне середовище	
	агар Сабуро	агар Чапека
Вміст органічних речовин, г/л Н ₂ О	пептон ферментатив. – 10, глюкоза – 40, дріжджовий екстракт – 5	сахароза – 30
Вміст неорганічних солей, г/л Н ₂ О	—	NaNO ₃ – 2, K ₂ HPO ₄ – 1, KCl – 0,5 MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,5г, FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,01г
Тип середовища за складом	напівсинтетичне	синтетичне
Вміст загусника, г/л Н ₂ О	агар-агар – 15	
Тип за щільністю	тверде (агарове)	
Особливі компоненти	лимонна кислота – 1	—
Кислотність готового середовища, од. рН	5,6 ±0,2	7,3 ±0,2 Підкислюють лимонною кислотою перед висівом
Метод стерилізації	автоклавування, 15-20 хв. при 121 ⁰ С	

Накопичувальні культури отримували після глибинного висіву розведеної (1:10 та 1:30) суспензії бджолиного обніжжя. Кожен висів робили в 4-8 повторях. Середнє значення колонієутворюючих одиниць грибів в 1 г обніжжя (КУО/г), відхилення від нього та помилку середнього вираховували за допомогою програми Microsoft Excel.

В чисту культуру, уколом, пересівали матеріал тих колоній з накопичувальної культури, які мали культуральні ознаки, характерні для представників класу зигоміцетів. До таких належали: великий розмір колоній, однорідна волокниста структура поверхні білого, сіро-білого чи темно-сірого

кольору, нитчасті краї, здатність до утворення на плівок на середовищі [1,14,15].

При посіві уколом користувались профламбованою та охолодженою бактеріологічною голкою. Для отримання чистих культур мікробний матеріал, декількома легкими рухами переносили на поверхню середовища в чашках Петрі. Найчастіше укол здійснювали в центр середовища, що в подальшому сприяло утворенню суцільних плівок у вигляді газонів.

Виділені ізоляти грибів досліджували у живому чи фіксованому вигляді за стандартними методиками [15]. При роботі з живими препаратами за методом «розчавленої краплі» на предметне скло наносили краплю води, з колонії грибів мікробіологічним гачком набирали мікробний матеріал, розподіляли у краплі води на площині 15*15 мм, закривали накривним скельцем, тримаючи його під кутом.

При проведенні простого фарбування мікробний матеріал розподіляли на предметному склі, на площі 1 см², фіксували полум'ям. Фіксований препарат заливали на 2-5 хв. розчином барвника: 3% спиртовою метиленовою синькою, розведеною водою в 5-10 разів або 0,5% водним кристалічним фіолетовим. Після закінчення фарбування препарат промивали водою, підсушували на повітрі та мікроскопіювали.

В готових живих чи фарбованих препаратах, при використанні світлового бінокулярного мікроскопу (окуляр 40X) визначали специфічні морфологічні ознаки зигоміцетів. В молодих культурах ними були: наявність чи відсутність ризоїдів, форма колонки та зрілого спорангію, форма і розміри спорангіоспор, в старих – форма, розміри та розміщення структур, необхідних для переживання несприятливих умов і подальшого вегетативного розмноження гриба (хламідоспор). Родову та видову належність ізолятів грибів встановлювали, порівнюючи їх культуральні та морфологічні ознаки з описом колоній і виглядом репродуктивних структур із наукових статей іноземних та вітчизняних вчених, довідників, атласів, підручників з мікології [10, 27-34].

2.2 Характеристика місця виконання роботи

Зразки обніжжя, використані для виділення мікроскопічних грибів класу зигоміцетів, були виготовлені на приватних пасіках Вінницької (№5, №6), Чернігівської (№9), Закарпатської (№17) та Хмельницької (№41) областей, закуплені на ярмарку в ННЦ «Інститут бджільництва ім. Прокоповича» (м. Київ), досліджені – в лабораторіях факультету ветеринарної медицини Поліського національного університету.

При підготовці до роботи використовували прилади для стерилізації посуду, середовищ та обладнання (сушильна шафа, автоклав), для культивування мікроорганізмів під час здійснення мікологічних досліджень – термостат, для вивчення морфологічних ознак грибів в чистих культурах різного віку – мікроскопи навчально-наукової лабораторія кафедри мікробіології, фармакології та епізоотології і навчально-науково-клінічно-діагностичної лабораторії факультету.

Для вирощування мікробів та вивчення їх ознак використовували різноманітне лабораторне обладнання та реагенти:

- стерильний посуд (чашки Петрі, піпетки кінцеві на 1 см³ або 2 см³, колби на 25-1000 см³, предметні скельця, мікробіологічні петлі та голки). Скляний посуд загортали в папір, в разі необхідності закривали ватно-марлевими корками і стерилізували в сушильній шафі при температурі 170 С впродовж 1,5 годин. Мікробіологічні петлі та голки, корки та горловини колб при посівах або виготовленні мікроскопічних препаратів фламбували за допомогою спиртівки. Предметні скельця для проведення мікроскопії промивали водою, протирали ефіром, зберігали – в банках з 96% етиловим спиртом;
- інше обладнання (фольга, пінцети, спиртівки, кювети, ваги, насоси для набору рідин, пластикові одноразові шприци). Пінцети та фольгу в упаковці із паперу стерилізували в сушильній шафі при температурі 180°С впродовж 30 хвилин;

- середовища і реактиви (загальні поживні середовища, розчини барвників, дистильована вода, фізіологічний розчин, спирт етиловий).

2.3 Результати власних досліджень

На використаних загальних середовищах (агари Чапека та Сабуро) колонії мукоральних грибів розвивались досить швидко, і помітний ріст спостерігався вже через 24-36 годин інкубації глибинних висівів за температури 27°C. Спільною культуральною ознакою у всіх угруповань був приблизно однаковий діаметр молодих колоній (1-3 см), а відмінною – особливості їх гілкування, специфіка якого найкраще виявлялась на агарі Чапека. На даному синтетичному середовищі, з вмістом сахарози та ряду неорганічних солей, розвивались колонії 2-х типів, які належали до різних видів грибів (рис.2.6).

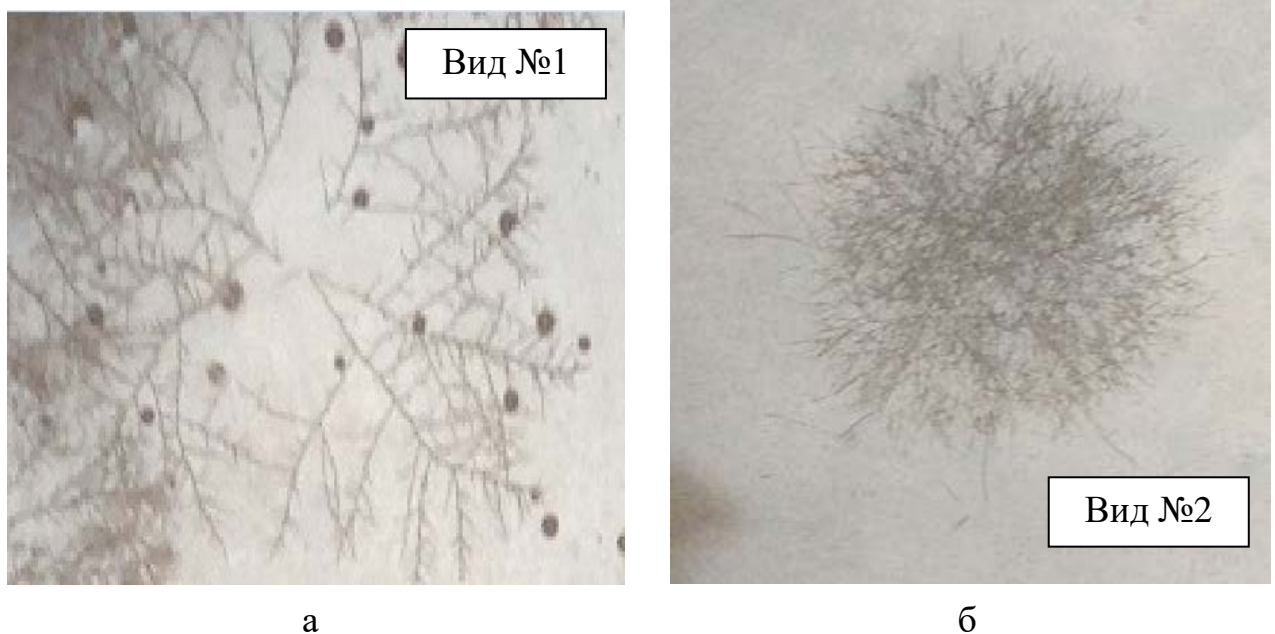


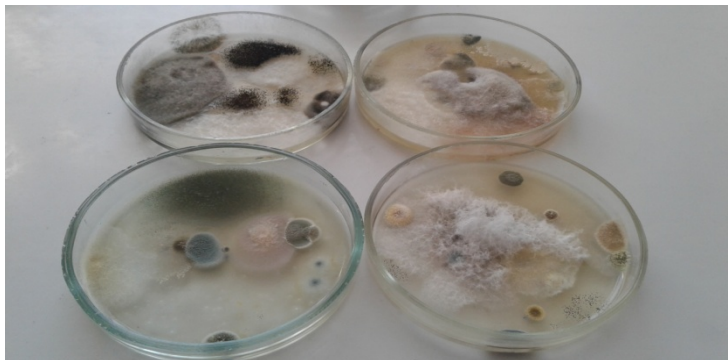
Рис. 2.6 Особливості гілкування гіф молодих однодобових колоній у грибів різних видів:

- а – колонії з моноподіальним гілкуванням;
б – колонії з дихотомічним гілкуванням

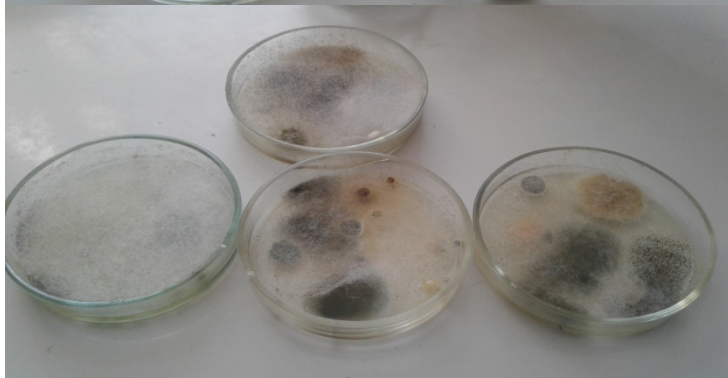
Тьмяні колонії виду №1 характеризувались рідким моноподіальним гілкуванням з перетинками, в результаті чого центр був майже прозорим, а край таких колоній – більш щільним внаслідок незначного перекривання розгалужених гілок міцелію. За формою росту апікальних крайових гіф можна

було припустити, що в майбутньому край таких колоній буде хвилястим чи зубчастим. Сіруваті колонії виду №2, внаслідок дихотомічного гілкування, були набагато щільнішими в центрі. Навіть в колоніях однодобової культури було помітно, що в подальшому край таких колоній має бути ризоїдним.

Лише на 3-6 добу росту на АЧ колонії мукоральних грибів розростались з утворенням плівки типу «рідкий газон». На АС, внаслідок великого вмісту органічного нітрогену та вуглеводів, на 3 добу росту мукоральні гриби утворювали плівки типу «суцільний газон», що робило неможливим кількісні обрахунки (рис. 2.7).



Зразок №5, агар Чапека,
3-я доба росту



Зразок №5, агар Чапека,
6-та доба росту



Зразок №5, агар Сабуро,
3-я доба росту

Рис. 2.7 Ріст колоній зразка №5 в накопичувальній культурі
на агарах Чапека та Сабуро (Вінницька обл.)

Мікробний матеріал плівок типу «газон» в накопичувальних культур з АЧ, був представлений білими, світло-сірими чи темно-сірими гіфами (спорангієносцями), на яких в більшості випадків неозброєним оком реєструвались спорангії у вигляді сферичних темних голівок (рис.2.8).

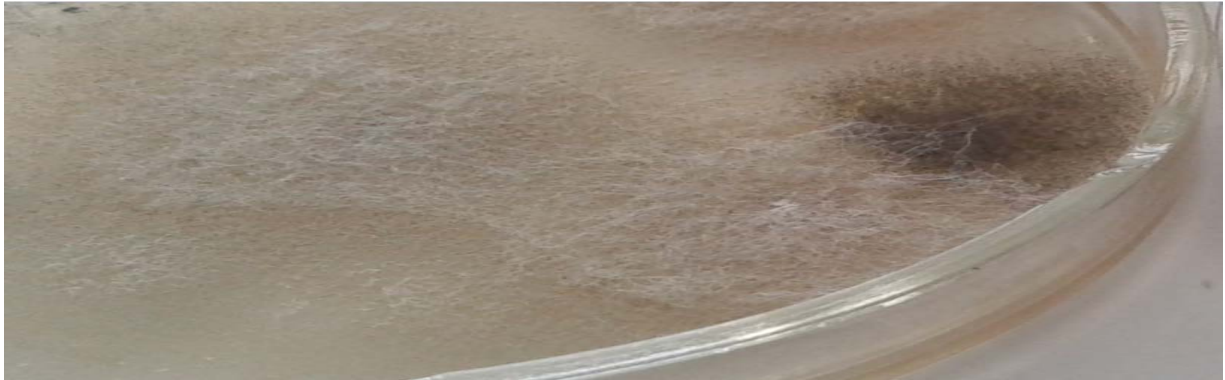


Рис. 2.8 Міцелій грибів різних видів (накопичувальні культури, агар Чапека)

Мікроби представлених «рідких газонів» з АЧ, при пересіві в чисті культури, швидко розвивались і на агарі Сабуро, утворюючи за 2-3 доби «суцільні газони». Саме тому агар Сабуро є оптимальним поживним середовищем для отримання чистих культур зигоміцетів, наявних у бджолиному обніжжі. Утворені «газони» чистих культур відрізнялись кольором

і структурою поверхні: сірий, білий та сіро-чорний щільні, сліпучо-білий та сіро-чорний «зім'ятий» (рис. 2.9).



зразок №6,
Вінницька обл.,
2 доба росту,
«біла щільна»
культура



зразок №17,
Закарпатська обл.,
3 доба росту,
«сіра щільна»
культура



зразок №41,
Закарпатська обл.,
3 доба росту,
«біла, з довгими
гіфами» культура

Рис 2.9 Розвиток чистих культур грибів порядку *Mucorales* на агарі Сабуро

Кількісний облік грибів можна було проводити на 3 добу, і результати отримані на агарі Чапека виявились більш статистично достовірними. Похибка середнього значення щодо кількості зародків грибів в 1 г зразка при кількісних

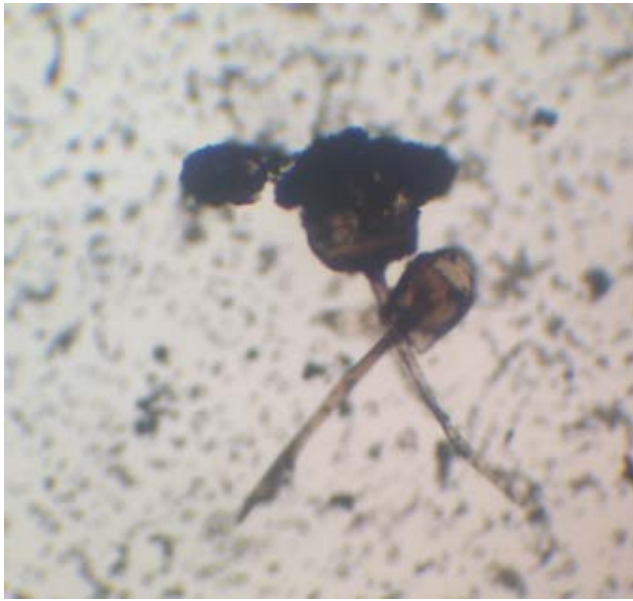
обрахунках в бактеріологічних та мікологічних дослідженнях може складати 30% (значення для наявних помилок коливається в інтервалі 7-25%). Але обрахунок кількості грибів в накопичувальних культурах при висівах на АЧ потрібно робити 2 рази – на третю та шосту добу інкубації, оскільки з табл.2.3 очевидно, що кількість колоній грибів збільшується на 10-30%, а інтервал помилок звужується до значень 6-15%.

Таблиця 2.3

Динаміка розвитку мікроскопічних грибів на агарі Чапека

№ зразка, місце виготовлення	3 доба		6 доба		Середній % приросту
	К-ть КУО/г	похибка середнього значення	К-ть КУО/г	похибка середнього значення	
№5 Вінницька	360 ± 60	16,6 %	440 ± 26	5,9%	22,2
№6 Вінницька	130 ± 15	11,5%	170 ± 26	15,3%	30,7
№9 Чернігівська	440 ± 113	25,7%	510 ± 69	13,5%	15,9
№17 Закарпатська	1840 ± 126	6,9%	2210 ± 130	6,0%	20,1
№ 41 Хмельницька	490 ± 72	14,7%	540 ± 65	12,0%	10,2

Мікроскопія живих препаратів, проведена з матеріалу чистих культур, показала наявність в зразках представників родів *Mucor* та *Rhizopus* (рис. 2.10 - 2.11). Певні культури грибів відносили до роду *Rhizopus* насамперед через наявність одноклітинного коричневого міцелію з широкими гіфами та явно вираженими коричневими ризоїдами, до роду *Mucor* – через виявлення одноклітинного безбарвного міцелію без ризоїдів та голівок спорангіїв меншого, ніж у *Rhizopus* розміру.



а



б

Рис. 2.10 Живі препарати грибів р. Rhizopus:

а – спорангієносці (видно трикутну апофізу та коричневу оболонку зруйнованого спорангієносця); б – розгалужені ризоїди коричневого кольору

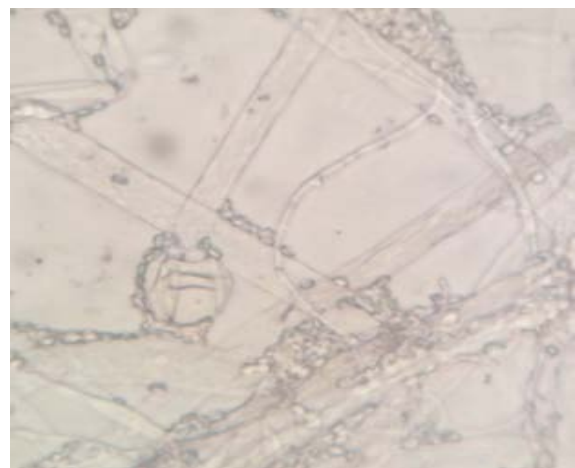
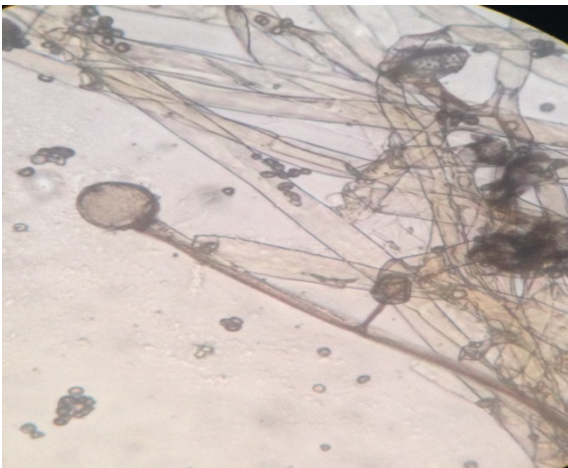


Рис. 2.11 Живі препарати грибів р. Mucor з безбарвними спорангієносцями та одноклітинними гіфами (видно оболонку зруйнованого спорангієносця; дугоподібні тонкі столони та великі овальні спорангіоспори)

Витримування чистих культур мукоральних грибів впродовж року при 4-5°C не змінило структури «суцільних газонів» (лише культури грибів з білим кольором спорангієносців набули кремового та бежевого кольору, представлені на рисунку 2.12). Спорангієносці було втрачено, живі спори у великій кількості залишились лише в одному ізоляті зразка №41 (рис 2.13), у всіх зразках утворилась велика кількість вегетативних хламідоспор .

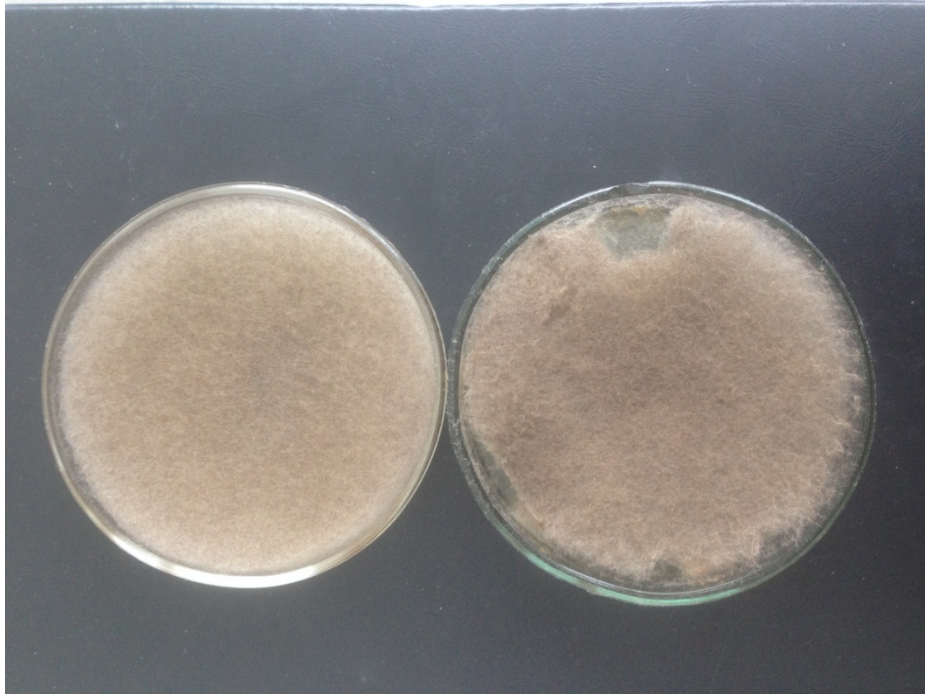


Рис.2.12 Вигляд чистих культур мукоральних грибів після збереження впродовж 1 року при 4-5°C (№5, Вінницька обл., зміна кольору міцелію «суцільних газонів» з білого на кремовий та бежевий)

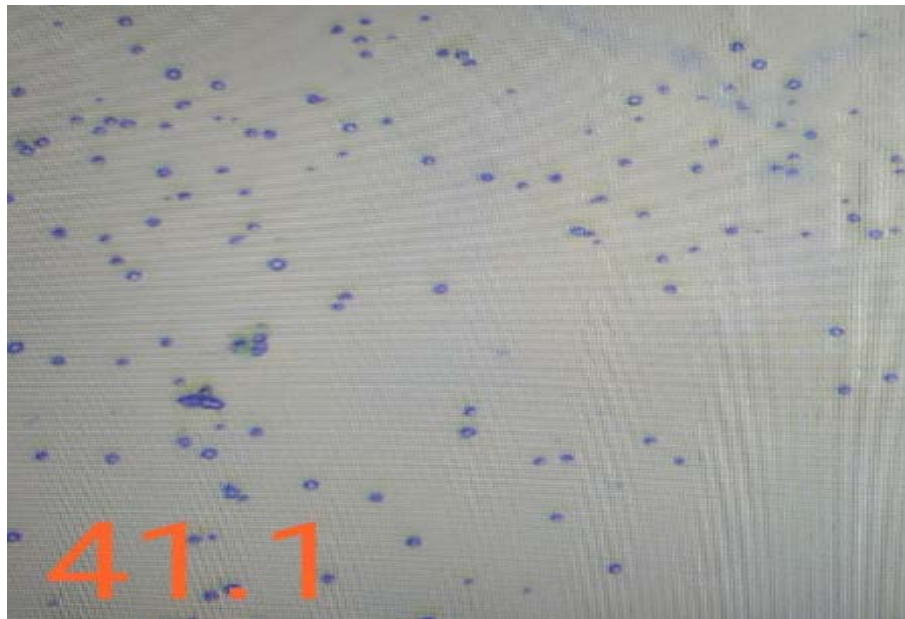


Рис.2.13 Округлі спорангіоспори, збережені після 1 року витримування культур при 4-5°C (один із ізолятів №41, Закарпатська область)

Товстостінні хламідоспори декількох типів (овальні із загостреними кінцями, поодинокі чи зібрані в групи круглі) утворюються внаслідок

фрагментації гіф і призначені для перенесення несприятливих умов та збереження виду (рис. 2.14).

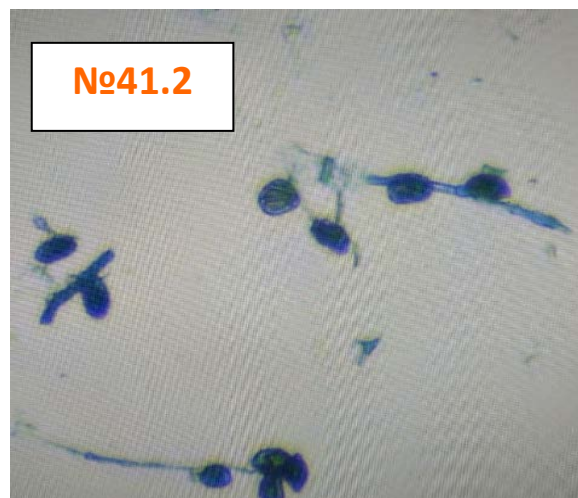
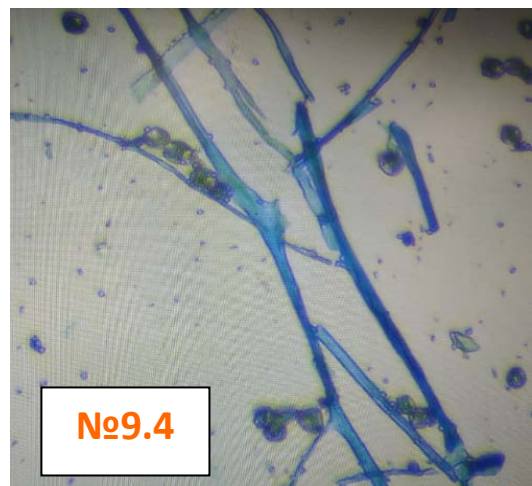
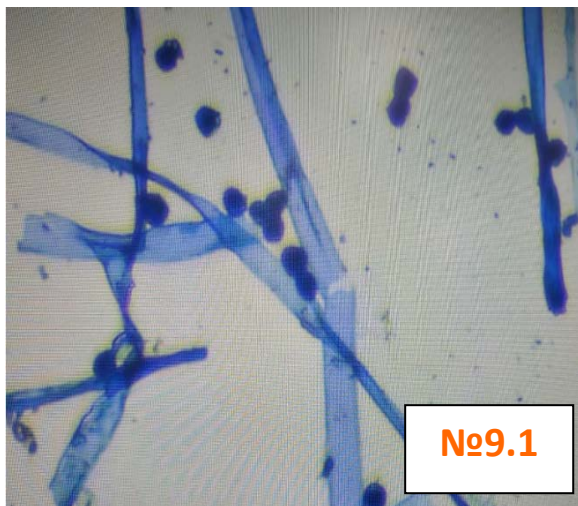
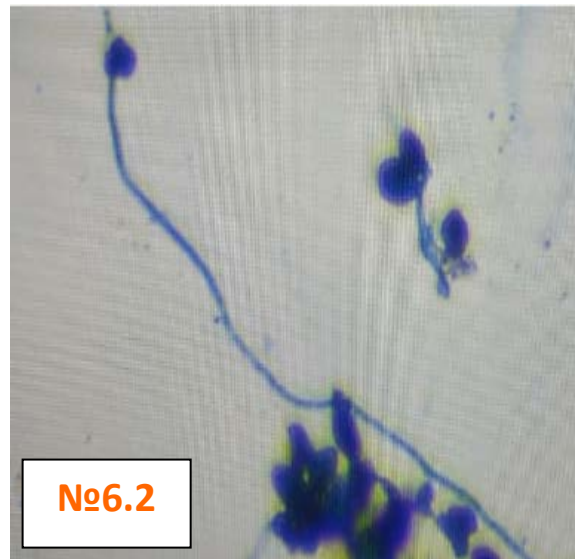


Рис. 2.14 Хламідоспори в старих культурах мукоральних грибів

Виявлені хламідоспори мають явно виражену тришарову оболонку, інтенсивно сприймають синій барвник під час фарбування або залишаються

напівпрозорими, розміщуються інтеркалярно (бічні), в окремих ізолятах (№ 6.1 та № 41.2) – на верхівках гіфи. Сумарний аналіз характеристик вегетативних спор (переважно – їх форма та тинкторіальні властивості) підтверджує раніше виявлений факт щодо наявності серед виділених ізолятів представників 2-х родів зигоміцетів.

Висновки до розділу 2

Мікробна асоціація грибів досліджуваних зразків бджолиного обніжжя визначається, переважно, епіфітною мікобіотою рослин різних регіонів України, з яких комахи (з квітня до червня) збирають пилок, з якого і виготовляються товарні партії обніжжя.

Опис культуральних ознак верхніх частин колоній накопичувальних/чистих культур та на їх зворотного боку (реверсуму) дозволяє відрізнити гриби різних родів, іноді – штами одного виду. Але морфологічні ознаки, без яких неможливо провести повноцінну ідентифікацію ізолятів, докладно вивчають під час проведення мікроскопічних досліджень.

Особливості будови гіфи та репродуктивних структур гриба, виявленні в світловій мікроскопії при роботі із живими та фарбованими препаратами, дозволяють швидко віднести ізолят гриба до певного роду, іноді – виду. Видова ідентифікація ізолятів проводиться за рахунок вивчення особливостей структури спорангієносців зигоміцетів, частини яких (колонка-колумела, апофіза, розмір і форма ендогенних спорангіоспор) мають специфічну будову. Додатковими структурами, придатними для визначення виду мікроба у зигоміцетів порядку Mucorales є вегетативні та статеві спори (хламідоспори та зигоспори, відповідно) і досить специфічні за довжиною, гілківанням, розмірами розростання нижніх частин гіфи (ризоїди).

РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Результати отримані після висіву суспензії, виготовленої із розведених зразків бджолиного обніжжя, співпадають з даними іноземних та вітчизняних вчених, які повідомляють, що представники мукоральних грибів постійно зустрічаються в мікологічній асоціації даного БАП (майже у 80% досліджуваних зразків) [35, 36].

Загальна кількість зародків грибів також співпадає з даними, отриманими різними групами дослідників в Україні, Росії, Болгарії, Бразилії (до 5 тис. КУО/г обніжжя) [37-39]. В досліджених зразках обніжжя, виготовленого в північній, центральній та західній частинах України, їх налічувалось від 130 до 2200 КУО/г. Отримані дані не відповідають показникам ДСТУ 3127-95 «Обніжжя бджолине (пилкок квітковий) і його суміші. Технічні умови» [40]. Оскільки з моменту затвердження стандарту (1995 р.) в мікології накопичилась значна кількість нових результатів, зазначений документ потребує удосконалення.

Облік грибів, проведений на третю та шосту добу продемонстрував, що при використанні агару Чапека для кількісних аналізів, утворені «рідкі газони» навіть на 6-ту добу росту не заважали обрахункам. Збільшення кількості колоній (з третьої до шостої доби росту – на 10-20%), свідчить про те, що в складі мікобіоти обніжжя присутні як види грибів із стрімким темпом розмноження (наприклад, мукоральні), так і з повільним.

З кожної із досліджених партій обніжжя виділили по 2-4 ізоляти мукоральних грибів, які існували в тісній асоціації з представниками роду *Aspergillus*, *Penicillium*. Зародки грибів зазначених родів з класу аскоміцетів зберігались при холодівому збереженні культур, і знову виділялись при повторних пересівах відповідної накопичувальної культури.

Мікроскопія чистих культур мукоральних грибів та порівняння вигляду їх специфічних морфологічних структур із матеріалами довідників, дисертацій та

наукових статей показала, що найчастіше в зразках з Вінницької, Чернігівської, Хмельницької та Закарпатської областей зустрічались представники родів *Mucor* (*Mucor hiemalis*, *M. racemosus*) та *Rhizopus* [27,29,30,32, 34, 41]. Необхідно зазначити, що серед виділених ізолятів переважали гриби роду *Rhizopus*, культуральні та морфологічні ознаки яких представлені на рис. 2.15.






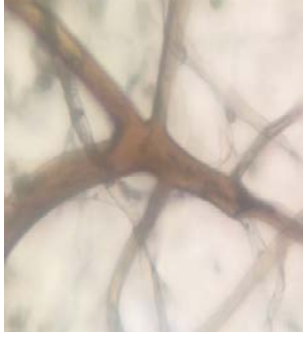

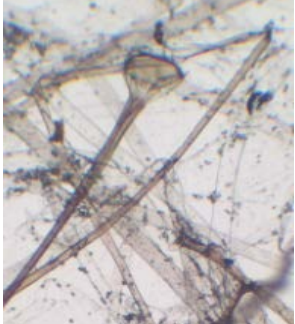
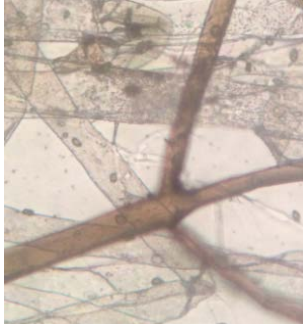

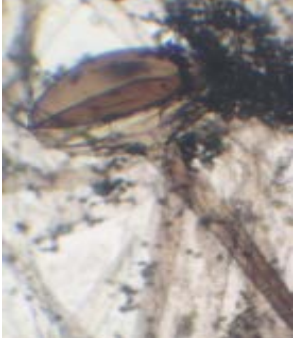

			<i>Rhizopus megasporus</i>
			<i>Rhizopus oryzae</i>
			<i>Rhizopus microsporus</i>
			<i>Rhizopus stolonifer</i>

Рис. 2.15 Культуральні і морфологічні ознаки різних видів роду *Rhizopus*

В чистих культурах на агарі Сабуро міцелій грибів даного роду був щільним, шерстистим. Колір його коливався від світло-сірого до чорно-сірого. Ризоїди, виявлені в мікроскопічних препаратах, були світло- або темно-коричневими, потужними, розгалуженими. Максимальна кількість великих та дрібних гілок ризоїдів (гілкування декількох порядків) була властива для виду *Rhizopus stolonifer*.

Спорангіоспори, вивільнені з-під оболонки спорангію, були еліптичними, овоїдні, іноді – округлими. Голівки спорангіїв круглі або видовжені. Геометрична форма апофізи була трикутною, але вигляд її змінювався від плоскою (тарілкоподібною) у *Rhizopus stolonifer* до об'ємної (чашоподібною) у *Rhizopus oryzae*.

Висновки до розділу 3

Мікроскопічні дослідження дозволили встановити, що 18 ізолятів грибів, які мали генетичний потенціал до швидкого росту на загальних поживних середовищах (агарах Чапека та Сабуро) належать до класу зигоміцетів, порядку *Mucorales*, родів *Mucor* (2 види) та *Rhizopus* (4 види). За повідомленнями вітчизняних та іноземних вчених у 2-х з виділених видів (*Mucor hiemalis*, *Rhizopus stolonifer*) реєструється здатність до токсиноутворення.

ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ

1. В досліджених зразках українського обніжжя (Чернігівська, Вінницька, Хмельницька, Закарпатська області) кількість міцеліальних грибів коливалась від 130 до 2200 КУО/г продукту.

2. В зразках зустрічались такі представники класу *Zigomycetes* порядку *Mucorales* як гриби родів *Mucor* (*Mucor hiemalis*, *M. racemosus*) та *Rhizopus* (*Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus megasporus*, *Rhizopus microsporus*). За літературними даними відомо, що до токсиноутворення здатні такі види виділених зигоміцетів як *Mucor hiemalis* та *Rhizopus stolonifer*.

3. Для кількісного обліку зародків грибів в зразках бджолиного обніжжя доцільно використовувати агар Чапека та розведену в 1:10 чи 1:30 суспензію біологічно активної добавки.

4. Для виявлення грибів, види яких генетично здатні розвиватись на синтетичних поживних середовищах з єдиним джерелом органічного карбону не лише швидко, але й повільно, облік результатів висівів необхідно проводити двічі – на 3-тю та 6-ту добу інкубації.

4. Чисті культури зигоміцетів порядку *Mucorales* рекомендовано виділяти на агарі Сабуро, де вже на 3-тю добу накопичується значна кількість біомаси грибів внаслідок утворення плівок типу «суцільний газон».

5. Всі види контамінантів бджолиного обніжжя (певні роди зигоміцетів в чистих культурах, роди аскоміцетів – в накопичувальних) задовільно зберігаються при 4-15°C впродовж 1-2 років і придатні для подальших пересівів та вивчення їх морфологічних та фізіологічних ознак.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Переведенцева Л.Г. Микология: грибы и грибоподобные организмы: учебное пособие. Пермь: Пермский гос. ун-т., 2009. 199 с.
2. Мирчинк Т.Г. Почвенная микология: учебник. Москва: Издательство МГУ, 1988. 220 с.
3. Lutzoni F., Kauff F., Cox C.J., et al. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany*. 2004. Т. 91. С. 1446-1480. doi:10.3732/ajb.91.10.1446.
4. Hibbett D.S. et al. A higher level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. 2007. 111 (5). P.509-547. doi:10.1016/j.mycres.2007.03.004.
5. Zygomycetes. вебсайт. URL: <http://www.zygomycetes.org/?s=genera> (дата звернення: 22.12.2020).
6. Cannon P.F., P.M. Kirk. Fungal families of the World. Wallingford. United Kingdom: CAB International, 2007. 456 p.
7. Індекс назв грибів. Species Fungorum: вебсайт. URL: <http://www.indexfungorum.org/> (дата звернення: 20.12.2020).
8. Шмидт Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия / пер. с нем. А. Виноградова, А. Синюшина. Москва: Бином. Лаборатория знаний, 2014. 328 с.
9. Ярошенко М. О. Плісневі сапрофіти – біотичні контамінанти кормів як можливе джерело мікозів сільськогосподарської птиці. *Ветеринарна медицина*. Вип.102, 2016. С.235-240.
10. Wagner L., Stielow J.B., de Hoog G.S. et al. A new species concept for the clinically relevant *Mucor circinelloides* complex. *Persoonia* 44, 2020. P. 67–97. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2020.44.03>
11. Greenberg R.N., Scott L.J., Vaughn H.H. et al. Zygomycosis (mucormycosis): emerging clinical importance and new treatments. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2004. 17. P. 517-525. doi: 10.1097/00001432-200412000-00003.

12. Chayakulkeeree M., Ghannoum M.A., Perfect J.R. Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2006. 25. P. 215–229. doi: 10.1007/s10096-006-0107-1.
13. Petrikkos G., Skiada A., Lortholary O. et al. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2012. 54 Suppl.1. P. 23–34. doi: 10.1093/cid/cir866.
14. Гарибова Л.В., Лекомцева С.Н. Основы микологии: Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов. Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2005. 225 с.
15. Билай В.И. Основы общей микологии: учебное пособие для вузов. Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1980. 360 с.
16. Билай В.Й., Пидопличко Н.М. Токсинообразующие микроскопические грибы. Киев: Вища школа, 1970. 123с.
17. Тутельян В.А., Кравченко Л.В. Микотоксины. Москва: Изд-во МГУ, 1985. 295 с.
18. Екологічна біохімія: Навч. посібник /В.М. Ісаєнко, В.М. Войціцький, Ю.Д. Бабенюк та ін. Київ: Книжкове видавництво НАУ, 2005. 440 с.
19. Жданова Н.М. Микола Макарович Пидопличко (до 100-річчя від дня народження). *Мікробіологічний журнал*. 2004. №2. С. 118-121.
20. Пидопличко Н. М. Грибная флора грубых кормов. Киев: Изд-во АН УССР. 1953. 487 с.
21. Reiss J. Biotoxic activity in the Mucorales. *Mycopathologia*.1993. v.121, p.123–127.
22. Reiß J. Studies on the ability of mycotoxins to diffuse in bread. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 1981. V.12(4). p. 239-241. doi:10.1007/BF00499495.
23. Botha A., Botes A. Mucor. Pathogenicity. *Encyclopedia of Food Microbiology (2-nd Edition)*. Academic Press, 2014. 3248 p.

24. Научный центр Himedia. Готовые питательные среды. Агар Чапека (для грибов). Вебсайт. URL: <http://www.himedialabs.ru/m075-m076> (дата звернення: 20.12.2020).

25. Научный центр Himedia. Готовые питательные среды. Агар Сабуро. Вебсайт. URL: <http://www.himedialabs.ru/m1067-m063> (дата звернення: 20.12.2020).

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

27. Пидопличко Н.М., Милько А.А. Атлас мукопальных грибов. Киев: Наукова думка, 1971. 117 с.

28. Застулка О.А., Якубчак О.Н. Качество и микологическая безопасность украинской пчелиной обножки. *Ученые записки УО ВГАВМ*. 2018. Т. 54. вып.1. С.100 -103.

29. Застулка О. О. Мікологічна безпечність та якість бджолиного обніжжя. Автореферат дис. канд. вет. наук:16.00.09 «Ветеринарно-санітарна експертиза». Київ: редакційно-видавничий відділ НУБіП України. 2019. 24 с.

30. Чекрыга Г. П. Экологические факторы формирования микробиоты и способ ее регулирования в продуктах медоносных пчел: дис. докт. биол. наук: 03.02.08 экология (биология). Краснообск:ФГБНУ СибНИТИП. 2014. 403 с.

31. Мюлер Э., Лефлер В. Микология: Пер.с нем. Москва: Мир,1995. 134 с.

32. Dolatabadi S., Walther G., van den Ende B.G., de Hoog S. Diversity and delimitation of *Rhizopus microsporus*. *Fungal Diversity*. 2013. P.7-20. doi: 10.1007/s13225-013-0229-6

33. Кашкин П.Н., Хохряков М.К, Кашкин А.П. Определитель патогенных, токсигенных и вредных для человека грибов. Ленинград: Медицина, 1979.272 с.

34. Кириленко Т.С. Атлас родов почвенных грибов. Киев: Наукова думка, 1977. 127 с.

35. Чекрыга Г. П. Факторы формирования микобиоты пыльцевой обножки медоносных пчел: Дис. канд. биол. наук: 03.00.16. Красноярск. 2006. 205 с.
36. Григорян К.М., Бриндза Я., Саргсян М.Р., Акопян Л.Л. К вопросу о контаминации обножковой пыльцы грибами и микотоксинами *Иммунопатология, аллергология, инфектология*, 2009. 2. С. 13-14.
37. Осинцева Л. А., Мотовилов К. Я., Чекрыга Г. П., Соловьева О. В. Эпифитная микрофлора обножки. *Пчеловодство*. 2005. № 10. С. 52-53.
38. Галатюк О.О., Якубчак О. М., Солодка Л.О. Органолептичні, фізико-хімічні та мікробіологічні показники бджолиного обніжжя різних регіонів України. *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. Збірник наукових праць*. Харків, 2015. №30. Ч. 2. С. 241-244.
39. O. Zastulka, O. Yakubchak, L. Solodka, O. Halatyuk. The contamination of bee pollen by microscopic fungi. *Науковий вісник Нац. Університету біоресурсів і природокористування України. Сер. «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва»*. 2015. Вип.223. С. 41-45.
40. Обніжжя бджолине (пиллок квітковий) і його суміші. Технічні умови. ДСТУ 3127-95. Київ: Держспоживстандарт України.1995. 25 с. (Національний стандарт України).
41. Аранчій С.В., Зон Г.А., Кінаш О.В. Мукоромікоз птиці (методичні рекомендації) Полтава: Головне управління ветеринарної медицини в Полтавській області, Полтавська державна аграрна академія, 2016. 40 с.

ДОДАТКИ

Додаток А

Хронологія опису грибів родів *Mucor* та *Rhizopus*

Таблиця 1

Хронологія опису грибів роду *Mucor*
(за даними бази Species Fungorum станом на 18.10.2019 р.)

№ з/п	Назва виду	Рік відкриття	Автор
1	2	3	4
1	<i>Mucor albus</i>	1789	Schrank
2	<i>Mucor caninus</i>	1796	Pers
3	<i>Mucor stercoreus</i>	1824	Link
4	<i>Mucor succosus</i>	1841	Berk
5	<i>Mucor mucedo</i>	1850	Fresen
6	<i>Mucor racemosus</i>	1850	
7	<i>Mucor plumbeus</i>	1864	Bonord
8	<i>Mucor circinelloides</i>	1875	Tiegh
9	<i>Mucor plasmaticus</i>	1875	
10	<i>Mucor erectus</i>	1884	Bainier
11	<i>Mucor fragilis</i>	1884	
12	<i>Mucor heterogamus</i>	1887	Vuill.
13	<i>Mucor piriformis</i>	1892	A.Fisch
14	<i>Mucor subtilissimus</i>	1898	Oudem
15	<i>Mucor nanus</i>	1994	Schipper, Samson
16	<i>Mucor adventitius</i>	1902	Oudem
17	<i>Mucor flavus</i>	1903	Bainier
18	<i>Mucor fuscus</i>	1903	
19	<i>Mucor hiemalis</i>	1903	Wehmer
20	<i>Mucor lausannensis</i>	1907	Lendn.
21	<i>Mucor genevensis</i>	1907	
22	<i>Mucor moelleri</i>	1908	
23	<i>Mucor griseocyanus</i>	1908	
24	<i>Mucor strictus</i>	1908	Hagem
25	<i>Mucor silvaticus</i>	1908	
26	<i>Mucor corticola</i>	1910	
27	<i>Mucor saturninus</i>	1908	
28	<i>Mucor lusitanicus</i>	1916	Bruderl.
29	<i>Mucor abundans</i>	1917	Povah
30	<i>Mucor guilliermondii</i>	1925	Надсон, Філіпов
31	<i>Mucor ramosissimus</i>	1927	Samouts.
32	<i>Mucor laxorrhizus</i>	1930	Y.Ling
33	<i>Mucor indicus</i>	1930	Lendn
34	<i>Mucor luteus</i>	1936	Linnem.
35	<i>Mucor inaequisporus</i>	1937	Dade

1	2	3	4
36	<i>Mucor odoratus</i>	1940	Treschew
37	<i>Mucor saprophilus</i>	1950	Novot.
38	<i>Mucor bacilliformis</i>	1954	Hesselt
39	<i>Mucor bondarzevii</i>	1960	Кулік
40	<i>Mucor azygosporus</i>	1963	R.K.Benj
41	<i>Mucor bainieri</i>	1963	B.S.Mehrotra, Baijal
42	<i>Mucor suhagiensis</i>	1964	M.D.Mehrotra,
43	<i>Mucor mousanensis</i>	1966	Baijal, B.S.Mehrotra
44	<i>Mucor zychae</i>	1966	
45	<i>Mucor falcatus</i>	1967	Schipper
46	<i>Mucor zonatus</i>	1967	Мілько
47	<i>Mucor aligarensis</i>	1970	B.S.Mehrotra, B.R.Mehrotra
48	<i>Mucor sinensis</i>	1971	Мілько, Белякова
49	<i>Mucor psychrophilus</i>	1971	Мілько
50	<i>Mucor ucrainicus</i>	1971	
51	<i>Mucor minutus</i>	1975	(Baijal, B.S.Mehrotra), Schipper
52	<i>Mucor amphibiorum</i>	1978	Schipper
53	<i>Mucor prayagensis</i>	1978	B.S.Mehrotra, Nand, Schipper
54	<i>Mucor variosporus</i>	1978	Schipper
55	<i>Mucor ardhaengiktus</i>	1979	B.S.Mehrotra, B.R.Mehrotra
56	<i>Mucor lahorensis</i>	1979	J.H.Mirza,S.M.Khan, S.Begum, Shagufta
57	<i>Mucor pakistanicus</i>	1979	
58	<i>Mucor punjabensis</i>	1979	
59	<i>Mucor thermohyalospora</i>	1983	Subrahm
60	<i>Mucor gigasporus</i>	1987	G.Q.Chen, R.Y.Zheng,
61	<i>Mucor hachijyoensis</i>	1994	Ts.Watan.
62	<i>Mucor meguroensis</i>	1994	
63	<i>Mucor troglophilus</i>	1997	Zalar
64	<i>Mucor eugenieae</i>	2001	L.S.Loh, Nawawi
65	<i>Mucor ravidus</i>	2001	
66	<i>Mucor sarawakensis</i>	2001	
67	<i>Mucor tanatus</i>	2001	
68	<i>Mucor delicatus</i>	2001	L.S.Loh, Kuthub
69	<i>Mucor sympodialis</i>	2001	
70	<i>Mucor verticillatus</i>	2001	
71	<i>Mucor renisporus</i>	2008	K.Jacobs, Botha
72	<i>Mucor ellipsoideus</i>	2011	E.Álvarez, Cano, Stchigel, Deanna A.Sutton, Guarro
73	<i>Mucor irregularis</i>	2011	Stchigel, Cano, Guarro, E.Álvarez
74	<i>Mucor nidicola</i>	2012	A.A.Madden, Stchigel, Guarro, Deanna A.Sutton, Starks
75	<i>Mucor ctenidius</i>	2013	(Durrell, Fleming), Walther, de Hoog
76	<i>Mucor fusiformis</i>	2013	Walther, de Hoog
77	<i>Mucor exponens</i>	2013	
78	<i>Mucor japonicus</i>	2013	

1	2	3	
79	<i>Mucor megalocarpus</i>	2013	Walther, de Hoog
80	<i>Mucor multiplex</i>	2013	(Zheng), Walther, de Hoog
81	<i>Mucor durus</i>	2013	Walther, de Hoog
82	<i>Mucor parvisseptatus</i>	2013	
83	<i>Mucor endophyticus</i>	2013	(Zheng, Jiang), J.Pawłowska, Walther
84	<i>Mucor lilianae</i>	2015	Voglmayr, Cléménçon
85	<i>Mucor rudolphii</i>	2015	
86	<i>Mucor koreanus</i>	2016	Hyang B.Lee, S.J.Jeon, T.T.Nguyen
87	<i>Mucor merdicola</i>	2016	C.A.F.de Souza, A.L.Santiago
88	<i>Mucor caatinguensis</i>	2016	A.L.Santiago, C.A.F.de Souza, D.X.Lima,
89	<i>Mucor circinatum</i>	2017	D.X.Lima, G.Walther, A.L.Santiago
90	<i>Mucor stercorarius</i>	2017	Hyang B.Lee, P.M.Kirk, T.T.T.Nguyen
91	<i>Mucor fluvii</i>	2018	Hyang B.Lee, S.H.Lee, T.T.T.Nguyen
92	<i>Mucor pernambucoensis</i>	2018	C.L.Lima, D.X.Lima, A.L.Santiago
93	<i>Mucor souzae</i>	2018	C.A.de Souza, D.X.Lima, A.L.Santiago
94	<i>Mucor amethystinus</i>	2019	Wagner, Walther
95	<i>Mucor atramentarius</i>	2019	
96	<i>M.cor pseudocircinelloides</i>	2019	
97	<i>Mucor pseudolusitanicus</i>	2019	
98	<i>Mucor variicolumellatus</i>	2019	
99	<i>Mucor orantomantidis</i>	2019	Hyang B.Lee, P.M.Kirk, T.T.T.Nguyen

Таблиця 2

Хронологія опису грибів роду *Rhizopus*

(за даними сайту <http://zygomycetes.org/index.php?id=70>)

№ з/п	Назва виду	Рік відкриття	Автор
2	<i>Rhizopus microsporus</i>	1875	van Tieghem
	<i>Rhizopus minimus</i>	1875	
3	<i>Rhizopus circinans</i>	1878	van Tieghem
4	<i>Rhizopus echinatus</i>	1878	
5	<i>Rhizopus oryzae</i>	1895	Went, Prinsen Geerl
6	<i>Rhizopus stolonifer</i>	1902	(Ehrenberg), Vuillemin
7	<i>Rhizopus equinus</i>	1903	Costantin, Lucet
8	<i>Rhizopus sexualis</i> var. <i>sexualis</i>	1940	(Smith), Callen
9	<i>Rhizopus megasporus</i>	1958	Boedijn
10	<i>Rhizopus homothallicus</i>	1961	Hesseltine, Ellis
11	<i>Rhizopus sexualis</i> var. <i>americanus</i>	1961	
12	<i>Rhizopus azygosporus</i>	1984	G.-F. Yuan, S.-C. Jong
13	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i>	1984	Schipper, Stalpers
14	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	1984	
15	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>lyococcus</i>	1984	
16	<i>Rhizopus caespitosus</i>	1994	Schipper, Samson
17	<i>Rhizopus schipperae</i>	1996	Weitzman, McGough, Rinaldi
18	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>tuberosus</i>	1998	Zheng, Chen