

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

ЗАСТУЛКА ОЛЬГА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 614.31:663.1:006.015.5:638.14

**МІКОЛОГІЧНА БЕЗПЕЧНІСТЬ ТА ЯКІСТЬ
БДЖОЛИНОГО ОБНІЖЖЯ**

16.00.09 «Ветеринарно-санітарна експертиза»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата ветеринарних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Національному університеті біоресурсів і природокористування України Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник доктор ветеринарних наук, професор
Якубчак Ольга Миколаївна,
Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
завідувач кафедри ветеринарно-санітарної
експертизи

Офіційні опоненти: доктор ветеринарних наук, професор
Бергілевич Олександра Миколаївна,
Сумський державний університет,
професор кафедри громадського здоров'я

кандидат ветеринарних наук, доцент
Фурман Світлана Володимирівна,
Житомирський національний
агроекологічний університет,
доцент кафедри паразитології,
ветеринарно-санітарної експертизи
та зоогієни

Захист відбудеться «19» червня 2019 року о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.14 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «17» травня 2019 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О. В. Журенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Бджолине обніжжя – квітковий пилок з тичинок рослин, зібраний бджолами, до якого вони додають нектар, секрет залоз і формують у грудочки, діаметром 2–3 мм, які приносять до вулика в кошиках на задніх ніжках. Обніжжя застосовується у бджільництві, харчовій промисловості в натуральному і переробленому вигляді, і для реалізації в торговельній мережі. Воно містить значну частку протеїнів, вуглеводів, ліпідів, вітамінів, мінералів, незамінних амінокислот, ферментів, фітонцидів, незамінних жирних кислот тощо.

У 2004 р. Міжнародна Медова Комісія в місті Удіне (Італія) представила проект світового стандарту бджолиного обніжжя, який передбачає вміст води в ньому не вище 6 %, золи – не більше 6 г, загального протеїну – не нижче 15 % у 100 г продукту. Фізико-хімічні показники бджолиного обніжжя в Україні достатньо відрізняються. Так, вміст золи у бджолиному обніжжі не регламентується, вміст води в ньому має становити не вище 10 %, загального протеїну – не нижче 21 %.

Високий вміст води у бджолиному обніжжі може сприяти зниженню показників безпечності та якості продукту, оскільки створюються сприятливі умови для розвитку мікроорганізмів. Свого часу В. І. Полтев (1967) з меду та бджолиного обніжжя виділив гриби, віднесені ним до 45 видів і різновидів, з яких 5 – небезпечні для людини і тварин. Було виділено культури *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, які синтезують афлатоксини, 3 види умовно-патогенних культур роду *Rhizopus*, 5 видів дріжджових грибів роду *Candida* і один вид – роду *Trichosporon*. Руденко Є. В. та І. Г. Маслій (1997) виділяли спори мікроскопічних грибів із 50 досліджених ними проб обніжжя медоносних бджіл.

Згідно з ДСТУ 3127-95 в Україні обсіменіння мікроскопічними грибами обніжжя не повинно перевищувати 100 КУО/г. Чекрига Г. П. (2006) у своїй науковій роботі пропонує збільшити кількість мікроскопічних грибів в 1 г обніжжя зі 100 до 1000 КУО. У Європейському Союзі наукова група експертів під керівництвом М. G. R. Campos (2004) пропонує вимоги, де вміст мікроскопічних грибів не повинен перевищувати 50000 КУО.

Отже, проведення досліджень мікологічної безпечності та якості бджолиного обніжжя в Україні є актуальним питанням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є складовою частиною наукових досліджень, виконаних в рамках ініціативної наукової теми кафедри ветеринарно-санітарної експертизи Національного університету біоресурсів і природокористування України «Науково-практичне обґрунтування якості та безпечності меду та бджолиного обніжжя» (номер державної реєстрації 0116U008146, 2016–2018 рр.).

Мета та завдання дослідження. Мета дослідження – визначити показники мікологічної безпечності та якості бджолиного обніжжя України та запропонувати способи зменшення контамінації його мікроскопічними грибами.

Відповідно до мети було поставлено та вирішено такі завдання:

- дослідити якість бджолиного обніжжя з різних регіонів України за органолептичними та фізико-хімічними показниками;
- створити карту-схему якості бджолиного обніжжя;
- визначити безпечність бджолиного обніжжя за бактеріологічними та мікологічними дослідженнями;
- удосконалити методи інкубації мікроскопічних грибів, виділених із бджолиного обніжжя;
- дослідити вміст грибів роду *Fusarium* у бджолиному обніжжі;
- обґрунтувати застосування агару МакКонкі для виявлення мікроскопічних грибів;
- провести ідентифікацію найпоширеніших грибів-контамінантів бджолиного обніжжя;
- розробити способи зменшення контамінації бджолиного обніжжя мікроскопічними грибами.

Об'єкт дослідження – мікологічна безпечність та якість бджолиного обніжжя.

Предмет дослідження – бджолине обніжжя, органолептичні, фізико-хімічні показники бджолиного обніжжя, кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів, мікологічне обсіменіння бджолиного обніжжя.

Методи дослідження: органолептичні (зовнішній вигляд, консистенція, колір, запах, смак, ураження шкідливими комахами та наявність ознак бродіння); фізико-хімічні (механічні домішки, масова частка води, величина рН 2 % водного розчину продукту, масова частка флавоноїдних сполук, окиснюваність (справжність), масова частка сирого протеїну); мікробіологічні (культивування мікроорганізмів, мікроскопія), статистичні (обробка цифрових показників результатів дослідження та оцінка їх достовірності за критерієм Стьюдента).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше визначено, що масова частка води в бджолиному обніжжі складає $8,77 \pm 0,2$ %, що майже на 3 % вище від вимог, встановлених в Європейському Союзі. Встановлено залежність вмісту сирого протеїну і величини рН. В обніжжі, де знижений вміст сирого протеїну, виявлено тенденцію до відхилення показника рН від норми в сторону його збільшення. Окиснюваність не має вагомого інформативного значення для товарного бджолиного обніжжя. Вперше з'ясовано, що на ринку України щороку є близько 21–37 % якісного бджолиного обніжжя за фізико-хімічними показниками згідно чинного ДСТУ 3127-95.

Встановлено, що зменшення величини рН до 4,5–5,0 в ростових середовищах Чапека та Сабуро сприяє пригніченню проростання мукоральних грибів і дозволяє прискорити виявлення інших мікроскопічних грибів, які можуть становити небезпеку для здоров'я людей і тварин. Виділені ізоляти грибів роду *Fusarium* із бджолиного обніжжя 2015 та 2016 рр. збору належать до виду *F. solani*.

Наукову новизну результатів досліджень захищено патентом України на корисну модель «Спосіб одночасного виявлення ентеробактерій та грибів-нейтрофілів у бджолиному обніжжі», який дозволяє впродовж 1–2 діб виявити умовно-патогенні грамнегативні ентеробактерії п'яти родів, полегшити облік результатів та ідентифікацію грибів. Вперше на середовищі МакКонкі було виділено та ідентифіковано в бджолиному обніжжі такі види мікроскопічних грибів: *Aspergillus niger* Tiegh., *A. fumigatus* Fresen., *A. flavus* Link., *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., *Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl. та *Mucor hiemalis* Wehmer. Загальна кількість мікроскопічних грибів у бджолиному обніжжі, зібраному в 15 областях України, коливалася в межах від 80 до 1200 КУО/г. Встановлено, що триразове заморожування та розморожування бджолиного обніжжя суттєво не зменшує вміст мікроскопічних грибів у готовому обніжжі. Розведення бджолиного обніжжя медом в 9 разів достовірно ($p < 0,01$) знижує вміст грибів у 7,9 раза, а розведення в 19 разів – зумовлює достовірне ($p < 0,01$) зниження кількості мікроскопічних грибів у 13,9 раза. У разі контамінації обніжжя мікроскопічними грибами родів *Mucor* та *Rhizopus* його безпечність можна забезпечити шляхом опромінення інфрачервоними променями впродовж години, завдяки чому знижується обсіменіння продукту даними грибами на 22,6 %.

Практичне значення одержаних результатів. Створення карти-схеми якості бджолиного обніжжя України дасть можливість пасічникам зосередити увагу на дотриманні гігієнічних вимог під час збору та підготовки продукту до зберігання. В акредитованих лабораторіях, зокрема, державних лабораторіях ветеринарно-санітарної експертизи агропродовольчих ринків, після органолептичних досліджень якості бджолиного обніжжя доцільно проводити визначення вмісту в ньому величини рН, вмісту води, сирого протеїну та масової частки флавоноїдів.

Доведено можливість застосування агару МакКонкі для удосконалення одночасного виявлення мікроскопічних грибів та бактерій у бджолиному обніжжі. Розроблено методичні рекомендації «Застосування агару МакКонкі для виявлення мікроскопічних грибів бджолиного обніжжя» (розглянуто, схвалено та рекомендовано до впровадження семінар-нарадою Головного управління Держпродспоживслужби в Житомирській області з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів, протокол № 02-00/1629 від 25 травня 2017 року), які можуть використовуватися у регіональних, міжрайонних та районних лабораторіях ветеринарної медицини, а також у науково-дослідних установах.

Для полегшення обрахунку мікроорганізмів рекомендується використовувати підкислені (з величиною рН 4,5–5,0) агари Чапека чи Сабуро, або перед висівом опромінювати проби інфрачервоними променями впродовж години. З метою зменшення контамінації мікроскопічними грибами обніжжя рекомендується розводити медом у співвідношенні 1:10 чи 1:20.

Результати досліджень використовуються під час проведення занять на кафедрах: ветеринарно-санітарної експертизи Національного університету біоресурсів і природокористування України; мікробіології, фармакології та

епізоотології Житомирського національного агроекологічного університету; ветеринарної гігієни, санітарії і експертизи Одеського державного аграрного університету; інфекційних та інвазійних хвороб Подільського державного аграрно-технічного університету; ветеринарно-санітарної експертизи, гігієни продуктів тваринництва та патанатомії імені Й. С. Загаєвського Білоцерківського національного аграрного університету.

Особистий внесок здобувача. Автором дисертації здійснено пошук та аналіз літературних даних, виконано експериментальні дослідження, проведено первинний аналіз отриманих даних. Разом з науковим керівником було визначено мету, завдання дисертації, інтерпретовано результати та сформульовано висновки. З наукових праць, опублікованих у співавторстві, у дисертації використано лише ті ідеї та положення, які є результатом особистої роботи здобувача.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертації доповідалися та обговорювалися на: Міжнародній науково-практичній конференції «Біологічно активні продукти бджільництва: актуальні питання одержання, переробки, використання» (м. Київ, 2015 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 10-річчю кафедри паразитології, ветеринарно-санітарної експертизи та зоогігієни «Проблеми заразної та незаразної патології тварин» (м. Житомир, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Роль аграрних вищих навчальних закладів у розвитку малих форм господарювання як фактора соціально-економічної стабільності сільських територій та самозайнятості населення» (м. Київ, 2016 р.); XVI Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу, аспірантів і студентів «Актуальні проблеми ветеринарної медицини» (м. Київ, 2017 р.); щорічній науково-практичній конференції молодих вчених, присвяченій 40-річчю заснування Інституту ветеринарної медицини НААН (м. Київ, 2017 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Епізоотологія, здоров'я та добробут тварин. Виклики сучасності» (м. Київ, 2017 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 16 наукових праць, з яких 3 статті у наукових фахових виданнях України, стаття у науковому фаховому виданні України, включеному до міжнародних наукометричних баз даних, стаття у науковому виданні іншої держави, стаття у науковому виданні України, включеному до міжнародних наукометричних баз даних, методичні рекомендації, патент України на корисну модель, 8 тез наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено на 169 сторінках, вона складається з анотацій, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел та додатків. Список використаної літератури налічує 127 джерел, у тому числі 36 латиницею. Дисертацію ілюстровано 33 таблицями та 40 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень. Дисертаційні дослідження виконано впродовж 2013–2018 рр. на кафедрі ветеринарно-санітарної експертизи Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Окремі фрагменти досліджень виконано у лабораторії якості продукції Національного наукового центру «Інститут бджільництва імені П. І. Прокоповича» НААН; на кафедрі мікробіології, фармакології та епізоотології Житомирського національного агроекологічного університету та в Національному науковому центрі «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААН. Експериментальні дослідження проведено в три етапи (рис. 1).

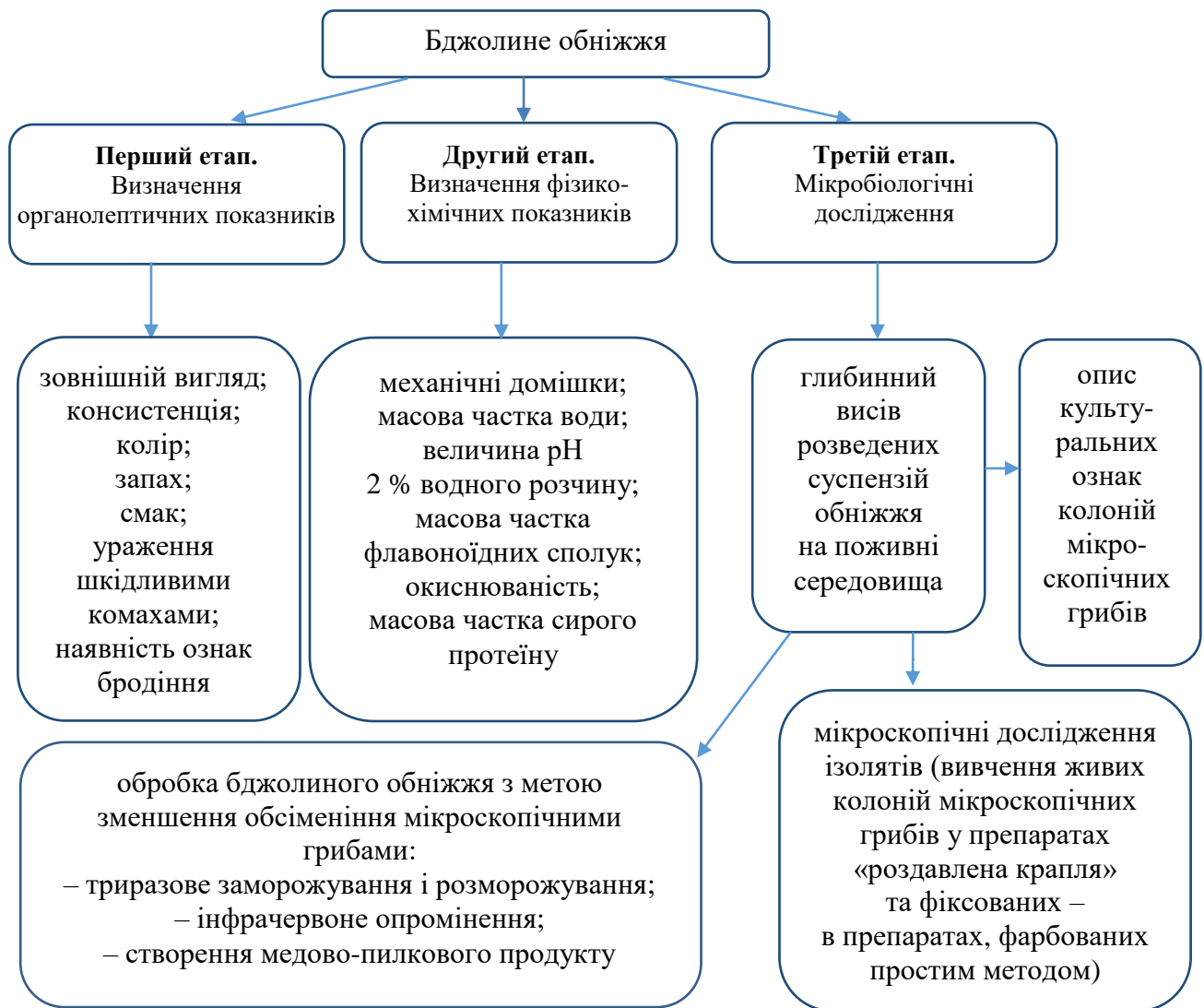


Рис. 1. Схема проведення досліджень

Матеріалом для дослідження слугувала 161 проба бджолиного обніжжя з 15 областей України (Черкаська, Вінницька, Кіровоградська, Київська, Закарпатська, Івано-Франківська, Хмельницька, Полтавська, Донецька, Чернігівська, Житомирська, Сумська, Миколаївська, Одеська, Херсонська). Проби відбирали на бджільницьких ярмарках (у травні та серпні

2013–2016 рр.), які проводилися на базі Національного наукового центру «Інститут бджільництва імені П. І. Прокоповича» НААН, де було представлено продукти бджільництва України. Відбір проб здійснювали згідно вимог чинного ДСТУ 3127-95.

Перший етап досліджень полягав у визначенні органолептичних показників бджолиного обніжжя, а саме: зовнішній вигляд, консистенція, колір, запах, смак, ураження шкідливими комахами та наявність ознак бродіння згідно вимог чинного ДСТУ 3127-95.

Другий етап присвячено визначенню фізико-хімічних показників бджолиного обніжжя: механічні домішки, масова частка води, величина рН 2 % водного розчину продукту, масова частка флавоноїдних сполук, окиснюваність, масова частка сирого протеїну. Всі показники визначали згідно ДСТУ 3127-95.

Третім етапом роботи були мікробіологічні дослідження, які включали глибинний висів розведених суспензій обніжжя на поживні агари (Чапека, Сабуро, МакКонкі), обрахунок кількості мікроскопічних грибів та опис культуральних ознак колоній. Домінуючі види мікроскопічних грибів піддавалися мікроскопічним дослідженням (вивчення живих мікроорганізмів в препаратах «роздавлена крапля» та фіксованих мікроорганізмів у препаратах, пофарбованих простим методом). Також було вивчено методи зменшення контамінації мікроскопічними грибами за допомогою заморожування, обробкою інфрачервоним опроміненням та створення медово-пилкового продукту.

Чашки з посівами поміщали в термостат на 24–48 год за температури 36 ± 1 °C для визначення бактерій (групи *E. coli*, роду *Salmonella* та *Staphylococcus aureus*); на 72 год – за температури 30 ± 1 °C – для визначення мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів і на 5 діб – за температури 24 ± 1 °C – для визначення мікроскопічних грибів. На 3 та 5 доби інкубації підраховували кількість отриманих колоній мікроорганізмів, детально описували їх культуральні ознаки для визначення кількості ізолятів в пробах.

Виділені ізоляти грибів досліджували в живому чи фіксованому вигляді. Під час роботи з живими препаратами за методом «роздавленої краплі» на предметне скло наносили краплю води, з колоній грибів бактеріологічною петлею відбирали частину колонії, розподіляли у воді на площині 15×15 мм, закривали покривним скельцем, тримаючи його під кутом. В готовому препараті за використання окуляру $40\times$ визначали морфологію мікроскопічних грибів та їх структур.

Для простого фарбування мікробний матеріал розподіляли на предметному склі на площі 1 см^2 , фіксували полум'ям. Фіксований препарат заливали на 2–5 хв 0,5 % водним розчином кристалічного фіолетового. Після закінчення фарбування препарат промивали водою, підсушували на повітрі та проводили мікроскопію. Збільшення контрастності препаратів досягали за рахунок використання імерсійної рідини (кедрова олія). Встановлення родової належності грибних ізолятів проводили за довідниками-атласами.

Під час проведення експерименту з вивчення способів зменшення контамінації бджолиного обніжжя мікроскопічними грибами його витримували у морозильній камері за температури -18°C упродовж 24 год, після триразового заморожування та розморожування проводили посіви на поживне середовище. Обробку обніжжя інфрачервоними променями проводили у мікробіологічному боксі впродовж години під 100 Вт лампою на відстані 40 см. Створення медово-пилкового продукту полягало у наступному: після подрібнення обніжжя на електричному млині додавався закристалізований мед з різнотрав'я у пропорціях 1:10 та 1:20.

Результати досліджень обробляли статистично за допомогою програми Microsoft Excel 2013, ступінь достовірності даних визначали за критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження органолептичних та фізико-хімічних показників бджолиного обніжжя. Проведено аналіз фізико-хімічних показників 161 проби бджолиного обніжжя, отриманого з різних регіонів України. Органолептичні показники та механічні домішки цих проб відповідали вимогам чинного ДСТУ 3127-95.

Із 161 проби дослідженого обніжжя в 98,1 % проб масова частка води відповідала вимогам чинного національного стандарту, а перевищення максимального показника (10 %) було встановлено лише у трьох пробах. Дані, наведені в табл. 1 засвідчують про те, що середній вміст води в бджолиному обніжжі, зібраному на пасіках в Україні, становить $8,77 \pm 0,2$ %.

Таблиця 1

**Фізико-хімічні показники бджолиного обніжжя
2013–2016 рр. збору ($M \pm m$; $n=161$)**

Показник	Результат досліджень	Вимога згідно чинного ДСТУ 3127-95
Вміст води, %	$8,77 \pm 0,2^*$	не вище 10
Величина рН	$5,32 \pm 0,22$	4,3–5,3
Вміст флавоноїдних сполук, %	$5,43 \pm 1,08$	не нижче 4,5
Окиснюваність, с.	$8,69 \pm 0,98^{**}$	22
Вміст сирого протеїну, %	$19,26 \pm 1,61$	не нижче 22

Примітка. Відмінність відносно показників ДСТУ 3127-95 достовірна, * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$

Величина рН 2 % водного розчину в 64 (39,8 %) досліджених пробах бджолиного обніжжя перевищувала показник, визначений чинним ДСТУ. Зокрема перевищення цього показника було встановлено у Вінницькій, Житомирській, Закарпатській, Івано-Франківській, Київській, Кіровоградській, Сумській, Херсонській областях.

Середній вміст флавоноїдних сполук у пробах бджолиного обніжжя, отриманого на пасіках України, становив $5,43 \pm 1,08$ %. Вміст флавоноїдних сполук в обніжжі, одержаному на пасіках Вінницької, Закарпатської,

Житомирської, Миколаївської, Сумської, Хмельницької та Чернігівської областей, становив 5,5 % і вище, тоді як в обніжжі, отриманому на пасіках Донецької, Івано-Франківської (Тисменецький район) та Одеської областей був нижчим від показника, визначеного у чинному національному стандарті.

Показник окиснюваності бджолиного обніжжя, зібраного в 2013–2016 рр., відповідав вимогам чинного національного стандарту. Отже, окиснюваність не є вагомим інформативним показником для бджолиного обніжжя.

У 20 пробах (48,8 %) бджолиного обніжжя, отриманому у 2016 р., вміст сирого протеїну був нижчий від вимог, регламентованих чинним ДСТУ (не нижче 22 %). У бджолиному обніжжі, отриманому з пасік Закарпатської, Одеської, Київської та Херсонської областей, вміст сирого протеїну був високим (від 21,6 до майже 28 %). Середній вміст сирого протеїну в бджолиному обніжжі становив $19,26 \pm 1,61$ %.

Проведений аналіз проб бджолиного обніжжя за 2013–2016 рр. збору показав, що в обніжжі, отриманому у 2013 р., лише 19 проб (36,5 %) відповідали вимогам чинного стандарту. У 2014 р. лише 12 проб (27,3 %) бджолиного обніжжя були якісними за фізико-хімічними показниками, тоді як у 2015 р. 7 проб із 26 (27 %) відповідали вимогам чинного ДСТУ 3127-95. У 2016 р. лише 20,5 % досліджених проб відповідали вимогам національного стандарту щодо фізико-хімічних показників. Водночас, необхідно зазначити, що тільки 27,8 % обніжжя повністю відповідає фізико-хімічним показникам, визначеним у чинному ДСТУ 3127-95. На підставі проведених досліджень за фізико-хімічними показниками було створено карту-схему якості бджолиного обніжжя (рис. 2).



Рис. 2. Карта-схема якості бджолиного обніжжя України за фізико-хімічними показниками

Величина рН, що перевищувала значення, визначені в чинному ДСТУ, виявлено в обніжжі 8 областей (Сумська, Київська, Житомирська, Вінницька, Кіровоградська, Херсонська, Івано-Франківська, Закарпатська), а низький вміст

протеїну – у обніжжі, отриманому на пасіках України 12 областей (Сумська, Чернігівська, Черкаська, Полтавська, Донецька, Житомирська, Вінницька, Кіровоградська, Херсонська, Івано-Франківська, Закарпатська, Миколаївська). Встановлено взаємозв'язок між величиною рН бджолиного обніжжя та вмістом у ньому сирого протеїну. У пробах обніжжя з низьким вмістом сирого протеїну величина рН збільшувалася. За фізико-хімічними показниками обніжжя, отримане на пасіках Хмельницької області, найбільшою мірою відповідало вимогам чинного національного стандарту, проте найбільше проб якісного обніжжя за дослідний період отримано з Черкаської області.

Мікробіологічні показники бджолиного обніжжя включають у себе дослідження на наявність патогенних стафілококів, колі-форм, мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів, сальмонел, грибів та дріжджів. Із 19 проб бджолиного обніжжя 2013 р., які за показниками якості відповідали вимогам ДСТУ 3127-95, було відібрано і проведено мікробіологічні дослідження 11 проб. На агарових середовищах в чашках Петрі встановлено інтенсивний ріст лише мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів та мікроскопічних грибів різних видів. З даних, наведених на рис. 3 видно, що обніжжя було контаміноване різною кількістю мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів та мікроскопічних грибів.

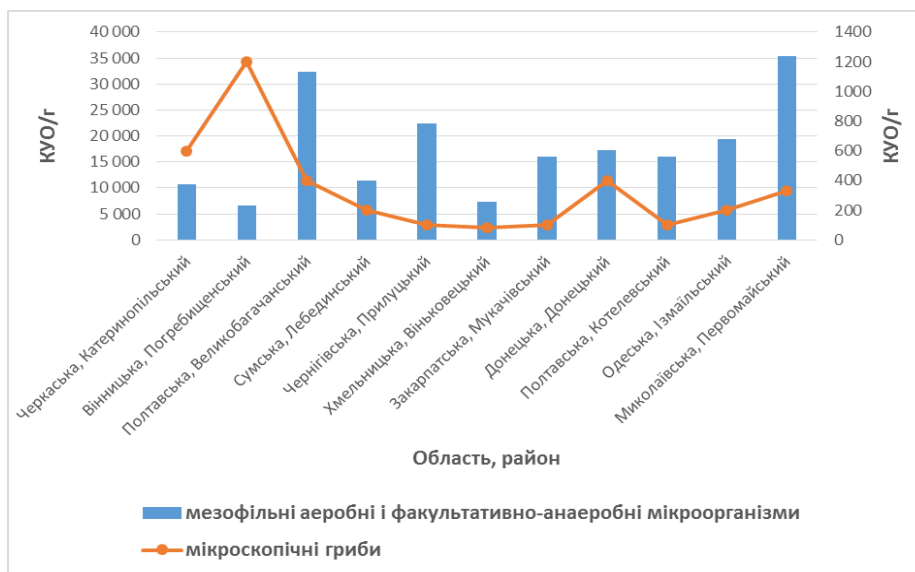


Рис. 3. Контамінація бджолиного обніжжя 2013 р. збору мезофільними аеробними та факультативно-анаеробними мікроорганізмами та мікроскопічними грибами

В пробах обніжжя кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів була в межах від 6,7 до 35,3 тис. КУО/г (див. рис. 3). Найбільшу кількість становили проби бджолиного обніжжя, в яких виявлено 16–23 тис. КУО (45,5 %) мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів в 1 г. Лише у двох пробах обніжжя виявлено відхилення кількості мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів від вимог чинного ДСТУ.

Не відповідали вимогам щодо обсіменіння мікроскопічними грибами 7 проб із 11, тобто 64 % (див. рис. 3). Найбільшу кількість мікроскопічних грибів було виявлено у бджолиному обніжжі, зібраному у 2013 р. на пасіках Черкаської, Вінницької, Полтавської та Донецької областей.

Вивчення доцільності застосування класичних агарів для виявлення мікроскопічних грибів. Під час аналізу мікологічних висівів бджолиного обніжжя було виявлено, що підрахунок кількості колоній мікроскопічних грибів на 7–10 добу для обніжжя неприйнятний, оскільки чашки Петрі цілком заростають мікроорганізмами. У зв'язку з цим, проведено мікробіологічні дослідження методом глибинного висіву розведених суспензій обніжжя на поживні агарові середовища Сабуро і Чапека. Перший підрахунок колоній здійснювали через 16 год, а потім кожні 4 год до 56 год після висіву. Поява міцелію, який можна побачити неозброєним оком та розвиток поодиноких колоній починається вже на 28–32 год (рис. 4).

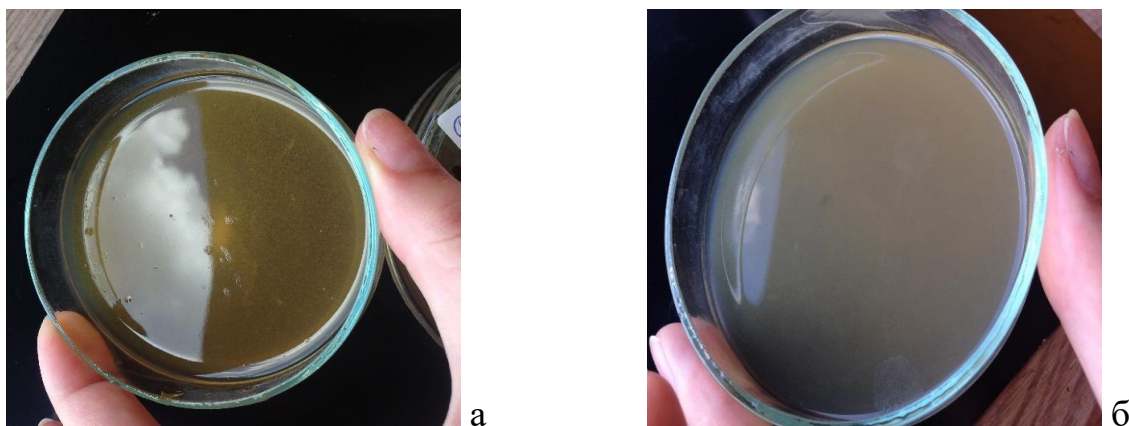


Рис. 4. Ріст мікроскопічних грибів через 30 год після висіву: а – поодинокі колонії на агарі Сабуро; б – поодинокі колонії на агарі Чапека

Гілкування колоній та ущільнення міцелію виявляється вже на 40–44 год (рис. 5).

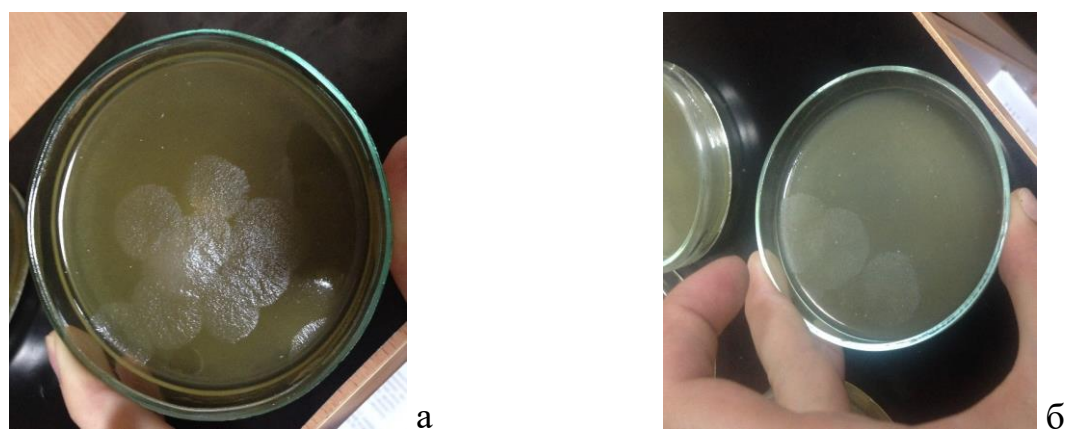


Рис. 5. Гілкування колоній та ущільнення міцелію мікроскопічних грибів через 42 год культивування на середовищах: а – Сабуро; б – Чапека

Збільшення діаметру колоній мікроскопічних грибів та початок спороносіння спостерігали на 48–52 год (рис. 6).

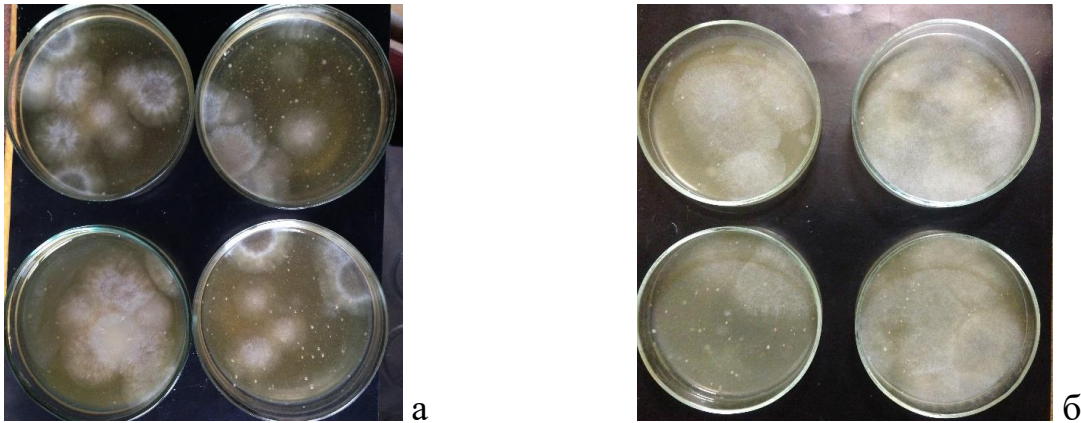


Рис. 6. Початок спороносіння на 50 год культивування: а – колонії мікроскопічних грибів на агарі Сабуро; б – колонії мікроскопічних грибів на агарі Чапека

З метою визначення середовища для обліку колоній мікроскопічних грибів з бджолиного обніжжя, було проведено експеримент, під час якого підраховували кількість великих і середніх колоній мікроскопічних грибів та кількість таких, що почали спороносити на 4 та 5 добу. У розведенні суспензії обніжжя 1:10 на агарі Чапека та Сабуро кількість мікроорганізмів в 1 мл достовірно не відрізнялася на 4 добу. Швидкість росту грибів на агарі Сабуро більша, ніж на агарі Чапека: у великих і середніх колоніях на 4 добу інтенсивність спороутворення становила 37,5–87,0 % на агарі Сабуро проти 0–63,7 % на агарі Чапека. На 5 добу на агарі Чапека відсоток спороносіння грибів, які вирости з проб обніжжя, зібраного у 2016 р. складав 45,2–75,0 %, а на агарі Сабуро – 30,0–62,5 %. Таку ж тенденцію було виявлено і у пробах 2015 р. (на 5 добу на агарі Чапека відсоток спороносіння становив 31,3–100,0 %, а на агарі Сабуро – 52,6–95,6 %). Таким чином, для вивчення контамінації бджолиного обніжжя мікроскопічними грибами можна використовувати агари Чапека або Сабуро.

Згідно чинного національного стандарту, для вирощування мікроскопічних грибів, що містяться у бджолиному обніжжі, рекомендується використовувати поживні середовища з величиною рН 5,5–6,0. Проте, за такої величини рН швидко розмножувалися мукоральні гриби, які дифузно росли та утворювали великі колонії (діаметр 3–4 см), що перешкоджало росту і, відповідно, виявленню мікроскопічних грибів інших видів. Встановлено, що за зниження величини рН поживних середовищ Чапека та Сабуро відповідно до 5,0 та 4,5 пригнічується ріст мукоральних грибів та прискорюється ріст мікроскопічних грибів інших видів, що здатні впливати на показники якості бджолиного обніжжя. З метою зниження величини рН поживних середовищ до них асептично вносили лимонну кислоту.

Дослідженнями встановлено значну контамінацію обніжжя мікроскопічними грибами роду *Fusarium*, які росли на агарі Чапека в

розведенні 1:10. Ріст подібних колоній на агарі Сабуро не реєструвався. У 2015 р. у бджолиному обніжжі, отриманому з різної місцевості України, було виявлено від 13 до 85 КУО мікроскопічних грибів *F. solani*, а в 2016 р. – від 15 до 65 КУО (табл. 2).

Таблиця 2

Наявність грибів роду *Fusarium* в бджолиному обніжжі (M±m; n=6)

Рік збору обніжжя	Кількість характерних колоній на агарі Чапека за розведення 1:10 (КУО/г обніжжя)	Місцевість походження обніжжя
2015	25±5	Полтавська область
	13±3	Черкаська область
	85±5	Хмельницька область
2016	15±3	Вінницька область
	38±10	Черкаська область
	65±10	Черкаська область

Примітка. В цій таблиці й далі КУО/г – колонієутворюючі одиниці в 1 г

Ідентифікувати мікроскопічні гриби можна лише після опису структури колоній, їх поверхні, пігментації повітряного міцелію та субстрату і вивчення морфології клітин мікроміцетів. Для цього із колоній з характерними ознаками на агарі Чапека шляхом двох або трьох пересівів виділяли чисті культури. Отримані колонії мікроскопічних грибів роду *Fusarium* мали павутинну структуру поверхні, нерівні краї, жовтуватий колір центральної частини, часто – біло-рожевий, іноді – жовто-зелену периферію, інтенсивну жовто-червону пігментацію поживного середовища навкруги молодих колоній або червоно-коричневу – навколо зрілих (рис. 7).

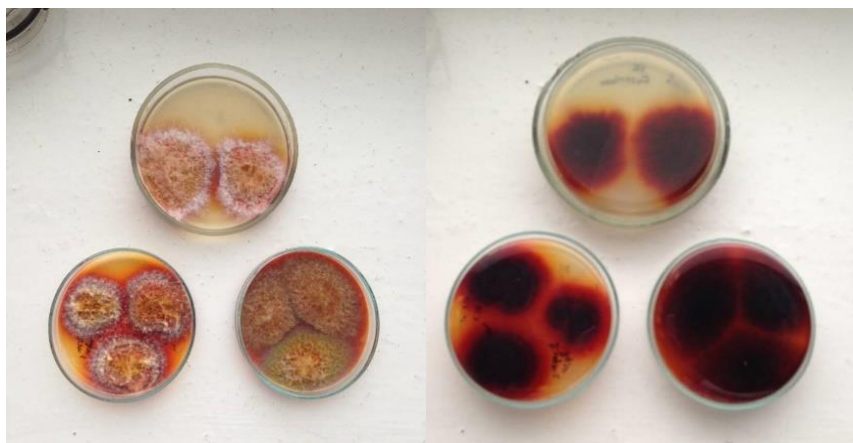


Рис. 7. Вигляд міцелію та зворотної сторони отриманих колоній мікроскопічних грибів роду *Fusarium*

Для ідентифікації мікроміцетів роду *Fusarium* мікроскопічними дослідженнями необхідно виявити конідії характерної форми і структури. В старих колоніях часто наявні хламідоспори декількох типів. Гіфи під різними кутами відходять від основної нитковидної клітини, а мікроконідії мають кулясту або еліптичну форму і найчастіше розташовані не групами, а поодиноці (рис. 8).

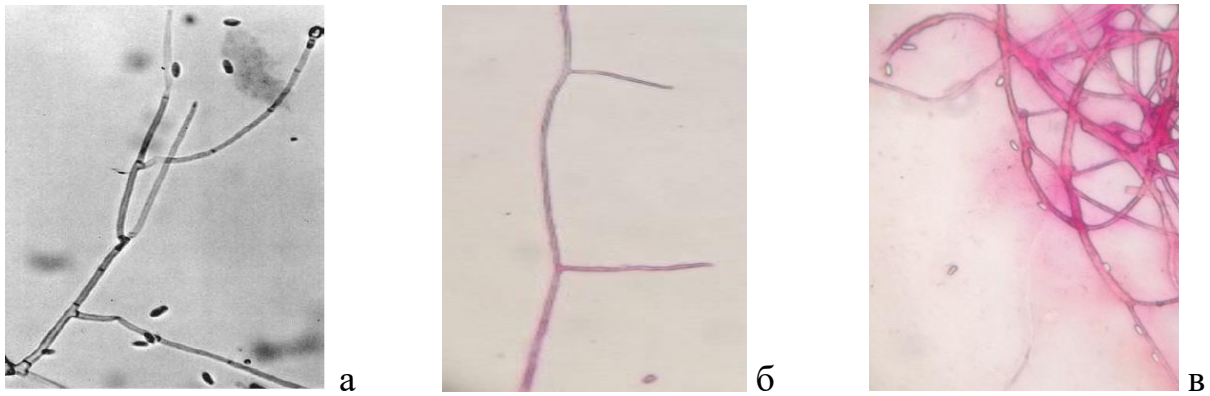


Рис. 8. Мікроскопічні препарати *F. solani*: а – за довідником Tsuneo Watanabe; б, в – отримані в експерименті

Співставлення отриманих препаратів з мікрофотографіями інших дослідників дозволяє віднести виділені ізоляти грибів з бджолиного обніжжя, заготовленого на пасіках України в 2015–2016 рр., до виду *F. solani*. Даний вид фузаріуму небезпечний тим, що виробляє фузарову кислоту та імунодепресант циклоспорин.

Застосування агару МакКонкі для виявлення мікроскопічних грибів дозволяє стверджувати, що в складі бджолиного обніжжя є штами грибів, здатних розщеплювати лактозу, пептиди та амінокислоти пептону в присутності жовчних солей і барвників. Визначення швидкості росту мікроскопічних грибів і її припинення на агарі МакКонкі проводилося з бджолиним обніжжям 2016 р. збору. Кількість колоній визначали за двох різних температурних умов: 24 ± 1 та 36 ± 1 °С. Отримані ентеробактерії обліковують через 24–48 год, необхідні ізоляти пересівають в чисту культуру. Зрілі колонії грибів, придатні для обліку, ідентифікації та пересіву, отримують через 5–7 діб. Необхідно зазначити, що на даному середовищі найчастіше виростають колонії середнього та великого діаметру з чітко вираженими культуральними ознаками. У представників родів *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* специфічні ознаки колоній виявляють вже через 2–4 доби після висіву, що значно прискорює ідентифікацію ізолятів.

Таким чином, спосіб одночасного виявлення ентеробактерій та грибів-нейтрофілів у бджолиному обніжжі дозволяє впродовж 1–2 діб виявити умовно-патогенні грамнегативні ентеробактерії п'яти родів, полегшити облік результатів та ідентифікацію грибів завдяки утворенню колоній середнього діаметру з чіткими культуральними ознаками.

Характерною ознакою усіх досліджених проб бджолиного обніжжя є багатий родовий склад і значна кількість мікроскопічних грибів родів *Rhizopus*, *Mucor* та *Aspergillus*. В пробах, якісних за органолептичними та фізико-хімічними показниками, було проведено аналіз культуральних та морфологічних ознак ізолятів мікроскопічних грибів за довідниками та атласами. Під час вирощування грибів на середовищі МакКонкі було встановлено, що найпоширенішими грибами-контамінантами бджолиного обніжжя були такі види мікроскопічних грибів: *Aspergillus niger* Tiegh.,

A. fumigatus Fresen., *A. flavus* Link., *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., *Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl. та *Mucor hiemalis* Wehmer (рис. 9).

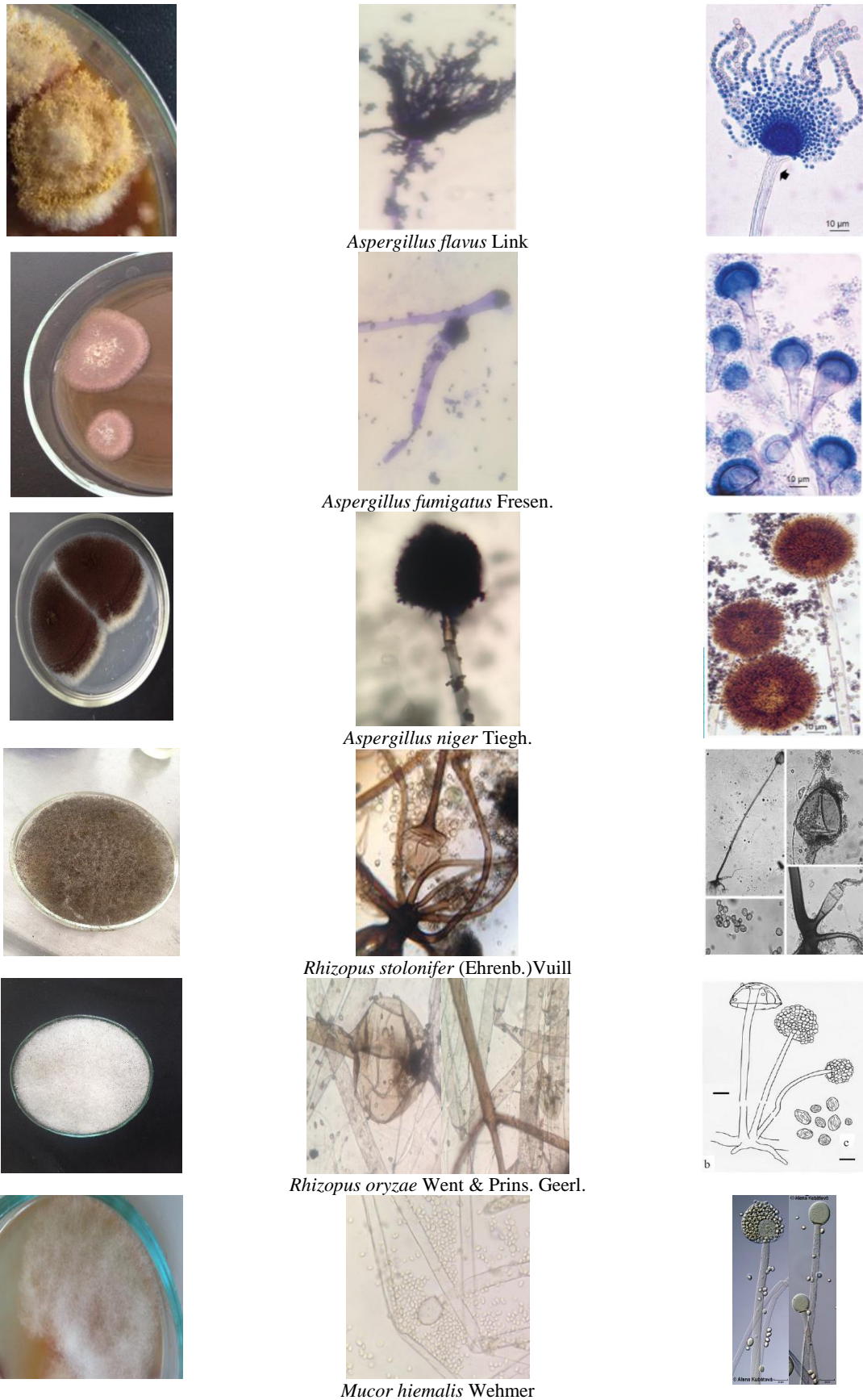


Рис. 9. Найпоширеніші гриби-контаміанти бджолиного обніжжя

Встановлено, що гриби роду *Aspergillus* краще ростуть за величини рН 7,0–7,2 та температури 25 °С. Ріст *Mucor hiemalis* за 35 °С пригнічений. Кращі ростові властивості *Rhizopus stolonifer* проявилися за 25 °С, а *Rhizopus oryzae*, навпаки, за 35 °С, тому він є особливо небезпечним, оскільки є не лише нейтрофілом, але й мікроорганізмом, який є небезпечним для організму тварини і людини.

Вміст мікроскопічних грибів у обніжжі, отриманому з різних областей України, становив від 80 до 1200 КУО/г. За результатами проведених досліджень у 2013–2016 рр. можна виділити п'ять областей, з яких регулярно надходить якісне бджолине обніжжя (табл. 3).

Таблиця 3

Вміст мікроскопічних грибів з регулярних областей-постачальників якісного бджолиного обніжжя, КУО/г (M±m)

Вінницька, n=4	Полтавська, n=3	Хмельницька, n=4	Черкаська, n=6	Чернігівська, n=3
1200	400	80	600	100
240	100	183	683	450
290	333	517	67	410
110	–	500	700	–
–	–	–	590	–
–	–	–	600	–
460±268	278±103	320±136	540±88	320±128

Найменш контаміноване обніжжя надходило з Полтавської області. Аналіз отриманих даних (див. табл. 3) дає підстави зробити висновок, що лише 20 % проб обніжжя містили допустиму кількість мікроскопічних грибів згідно з чинним національним стандартом.

Вплив низької температури, інфрачервоного опромінення та розведення медом на вміст мікроскопічних грибів у бджолиному обніжжі. Дослідженнями встановлено значну кількість мікроскопічних грибів у бджолиному обніжжі, що перевищує норми чинного стандарту, тому було проведено експеримент щодо пошуку способів зменшення його контамінації.

Під час дослідження шести якісних проб бджолиного обніжжя за органолептичними та фізико-хімічними показниками було застосовано метод заморожування, інфрачервоне опромінення та розведення медом. Проби розтирали на електричному млині, потім відбирали по 1 г обніжжя, після чого проводили триразове заморожування та розморожування за температури –18 °С. Аналогічні проби опромінювали в боксі за кімнатної температури лампою з інфрачервоним промінням. Також із дослідних проб готували мед із вмістом 5 та 10 % пилку. Результати досліджень наявності мікроскопічних грибів до та після обробки бджолиного обніжжя представлено в табл. 4.

Дослідження зниження контамінації бджолиного обніжжя мікроскопічними грибами дозволило констатувати, що подрібнення на електричному млині, триразове заморожування та розморожування бджолиного обніжжя не дає можливості суттєво зменшити кількість мікроскопічних грибів

у ньому. Розведення в 9 разів бджолиного обніжжя медом достовірно ($p < 0,01$) знижує вміст грибів у 7,9 раза, а розведення в 19 разів зумовлює достовірне ($p < 0,01$) зниження кількості мікроскопічних грибів у 13,9 раза.

Таблиця 4

Наявність мікроскопічних грибів у бджолиному обніжжі після заморожування, інфрачервоного опромінення та виготовлення медово-пилкового продукту, КУО/г ($M \pm m$; $n=6$)

Вихідна кількість	Після заморожування	Після опромінення	Після виготовлення 5 % медово-пилкового продукту	Після виготовлення 10 % медово-пилкового продукту
240	200	130	17	25
290	320	350	23	40
410	600	375	40	70
1050	910	740	64	125
590	420	350	38	55
600	684	514	46	85
530 ± 121	522 ± 117	410 ± 81	$38 \pm 7^*$	$67 \pm 15^{**}$

Примітка. Відмінність відносно показників до обробки бджолиного обніжжя достовірна, * $p < 0,01$, ** $p < 0,01$

У разі контамінації обніжжя мікроскопічними грибами родів *Mucor* та *Rhizopus* його безпечність можна підвищити шляхом опромінення інфрачервоними променями впродовж години, завдяки чому знижується обсіменіння бджолиного обніжжя даними грибами на 22,6 %.

ВИСНОВКИ

У дисертації узагальнено результати комплексних досліджень показників мікологічної безпечності та якості бджолиного обніжжя, отриманого на пасіках різних областей України. За фізико-хімічними показниками лише 21–37 % бджолиного обніжжя відповідає вимогам чинного національного стандарту, а його обсіменіння мікроскопічними грибами у 3–5 разів перевищує встановлений допустимий рівень. Створений медово-пилковий продукт містив у 7,9–13,9 раза меншу кількість мікроскопічних грибів, ніж вихідне бджолине обніжжя.

1. За органолептичними показниками (зовнішній вигляд, колір, консистенція, запах, смак, ураження шкідливими комахами та наявність ознак бродіння) досліджене бджолине обніжжя відповідає вимогам чинного ДСТУ 3127-05.

2. Вміст води у бджолиному обніжжі складає $8,77 \pm 0,2$ %, що відповідає вимогам чинного національного стандарту України (до 10 %), але перевищує вимоги Європейського Союзу майже на 3 %.

3. У 39,8 % проб обніжжя величина рН відхиляється від норми у бік підвищення і в цілому становить $5,32 \pm 0,22$. Масова частка флавоноїдних сполук у бджолиному обніжжі складає $5,43 \pm 1,08$ %. Високий вміст (від 5,5 % і

вище) встановлено в обніжжі з Вінницької, Закарпатської, Житомирської, Миколаївської, Сумської, Хмельницької та Чернігівської областей.

4. Вміст сирого протеїну в бджолиному обніжжі складає $19,26 \pm 1,61$ %. В Закарпатській, Івано-Франківській, Житомирській, Вінницькій, Кіровоградській, Херсонській та Сумській областях, де знижений даний показник, є тенденція до відхилення величини рН у бік підвищення.

5. Створена карта-схема якості бджолиного обніжжя за дослідний період вказує, що найкращі фізико-хімічні показники властиві обніжжю, одержаному в Хмельницькій області.

6. Перевищення кількості мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів від допустимих рівнів реєстрували лише у 18,2 % проб бджолиного обніжжя, яке відповідало вимогам за органолептичними та фізико-хімічними показниками, що свідчить про важливість дослідження останніх.

7. Експериментально обґрунтовано, що для вирощування та підрахунку колоній мікроскопічних грибів необхідно використовувати агари Чапека чи Сабуро з величиною рН 4,5–5,0.

8. Для виявлення грибів роду *Fusarium* необхідно застосовувати агар Чапека та суспензію обніжжя у розведенні 1:10. У 2015 р. у бджолиному обніжжі виявлено 13–85 КУО мікроскопічних грибів *F. solani*, а в 2016 р. – від 15 до 65 КУО.

9. З метою визначення родів мікроскопічних грибів експериментально обґрунтовано доцільність використання агару МакКонкі для одночасного виявлення ентеробактерій та грибів-нейтрофілів. Застосування агару МакКонкі у мікологічних дослідженнях бджолиного обніжжя дає можливість встановити домінування таких видів як *Aspergillus niger* Tiegh., *A. fumigatus* Fresen., *A. flavus* Link., *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., *Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl. та *Mucor hiemalis* Wehmer.

10. У разі контамінації бджолиного обніжжя мікроскопічними грибами родів *Mucor* та *Rhizopus* його безпечність можна забезпечити шляхом опромінення інфрачервоними променями впродовж години, завдяки чому знижується обсіменіння бджолиного обніжжя даними грибами на 22,6 %. Розведення бджолиного обніжжя медом в 9 разів достовірно ($p < 0,01$) знижує вміст мікроскопічних грибів у 7,9 раза, а розведення в 19 разів зумовлює достовірне ($p < 0,01$) зниження кількості мікроскопічних грибів у 13,9 раза.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. З метою виявлення, проведення обліку та оцінки ізолятів мікроскопічних грибів-нейтрофілів у бджолиному обніжжі пропонуються до використання методичні рекомендації «Застосування агару МакКонкі для виявлення мікроскопічних грибів бджолиного обніжжя», що містять нові підходи до застосування агару МакКонкі. У рекомендаціях подано методику роботи, яку рекомендовано для застосування у регіональних, міжрайонних та

районних лабораторіях ветеринарної медицини, а також у науково-дослідних установах.

2. Патент на корисну модель «Спосіб одночасного виявлення ентеробактерій та грибів-нейтрофілів у бджолиному обніжжі» дозволяє впродовж 1–2 діб виявити умовно-патогенні грамнегативні ентеробактерії п'яти родів, полегшити облік результатів та ідентифікацію грибів, завдяки утворенню колоній середнього діаметру, з чіткими культуральними ознаками, зекономити поживні середовища та лабораторний посуд під час дослідження бджолиного обніжжя за рахунок сумісного виділення мікроорганізмів різних морфологічних груп.

3. Для вирощування мікроскопічних грибів з бджолиного обніжжя рекомендується використовувати підкислені (з величиною рН 4,5–5,0) агари Чапека чи Сабуро або перед висівом опромінювати проби інфрачервоними променями впродовж години для зменшення росту мукоральних грибів, які заважають проводити обрахунок колоній. Для виявлення грибів роду *Fusarium* необхідно застосовувати агар Чапека та суспензію обніжжя у розведенні 1:10.

4. Розведення бджолиного обніжжя медом в 9–19 разів достовірно ($p < 0,01$) знижує вміст мікроскопічних грибів у 7,9–13,9 раза, що дає можливість використовувати даний продукт як біологічну активну добавку.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Галатюк О. О. (Застулка О. О.), Якубчак О. М., Солодка Л. О. Органолептичні, фізико-хімічні та мікробіологічні показники бджолиного обніжжя різних регіонів України. Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. Серія: Ветеринарні науки. 2015. Вип. 30. Ч. 2. С. 241–244. *(Здобувачем проведено органолептичні, фізико-хімічні та мікробіологічні дослідження, здійснено аналіз результатів, підготовлено статтю).*

2. Застулка О. О., Солодка Л. О., Чала І. В. Фізико-хімічні показники бджолиного обніжжя з Лісостепу України. Науково-технічний бюлетень Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК. 2016. Т. 4. № 4. С. 36–40. Режим доступу до статті: <https://bulletin-biosafety.com/index.php/journal/article/view/45/42>. *(Здобувачем проведено дослідження показників якості бджолиного обніжжя, здійснено аналіз результатів, підготовлено статтю).*

3. Застулка О. О. Способи зниження контамінації мікроскопічними грибами бджолиного обніжжя. Біологія тварин. 2018. Т. 20. № 1. С. 49–53.

Стаття у науковому фаховому виданні України,

включеному до міжнародних наукометричних баз даних

4. Застулка О. О., Якубчак О. М., Солодка Л. О. Контамінація українського бджолиного обніжжя грибами роду *Fusarium*. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. 2017.

Вип. 265. С. 123–131. *(Здобувачем проведено мікробіологічні дослідження, спрямовані на виявлення та ідентифікацію фузаріїв, здійснено аналіз результатів, підготовлено статтю).*

Стаття у науковому виданні іншої держави

5. **Застулка О. А., Якубчак О. Н.** Качество и микологическая безопасность украинской пчелиной обножки. Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины. 2018. Т. 54. Вып. 1. С. 100–103. *(Здобувачем проведено мікробіологічні дослідження, спрямовані на ідентифікацію грибів-контрамінантів обніжжя, здійснено аналіз результатів, підготовлено статтю).*

Стаття в науковому виданні України,

включеному до міжнародних наукометричних баз даних

6. **Zastulka O., Yakubchak O., Solodka L., Halatyuk O.** The contamination of bee pollen by microscopic fungi. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва. 2015. Вип. 223. С. 40–46. *(Здобувачем проведено дослідження показників мікробіологічної безпечності, здійснено аналіз результатів, підготовлено статтю).*

Методичні рекомендації

7. **Якубчак О. М., Солодка Л. О., Застулка О. О.** Застосування агару МакКонкі для виявлення мікроскопічних грибів бджолиного обніжжя: [методичні рекомендації]. К., 2017. 18 с. *(Затверджено вченою радою факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України, протокол № 10 від 18 травня 2017 року та науково-методичною радою головного управління Держпродспоживслужби в Житомирській області з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів, протокол № 02-00/1629 від 25 травня 2017 року. Здобувачем проведено дослідження та підготовлено матеріали для написання методичних рекомендацій).*

Патент України на корисну модель

8. **Якубчак О. М., Солодка Л. О., Застулка О. О.** Патент України на корисну модель 117991 Україна. МПК С12N 1/00, С12N 1/14 (2006.01), С12N 1/20 (2006.01), С12M 1/00, С12M 1/22 (2006.01) Спосіб одночасного виявлення ентеробактерій та грибів-нейтрофілів у бджолиному обніжжі; заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України. № u201702953; заявлено 28.03.17; опубліковано 10.07.2017. Бюл. № 13. *(Здобувачем розроблено принцип корисної моделі, проведено патентний пошук, підготовлено матеріали до патентування).*

Тези наукових доповідей:

9. **Застулка О. О.**, Солодка Л. О., Вишневський А. О., Романюк Т. О. Фізико-хімічні показники бджолиного обніжжя, зібраного в Україні. Проблеми заразної та незаразної патології тварин: Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 10-річчю кафедри паразитології, ветеринарно-санітарної експертизи та зоогієни, м. Житомир, 2–4 листопада 2016 року: тези доповіді. Житомир, 2016. С. 89–94. *(Здобувачем проведено фізико-хімічні дослідження бджолиного обніжжя, здійснено статистичну обробку, підготовлено матеріали до друку).*

10. **Застулка О. О.**, Якубчак О. М. Порівняльна характеристика вмісту флавоноїдів в бджолиному обніжжі України. Здобутки студентської молоді у вирішенні науково-практичних питань ветеринарної медицини: III (70) Міжнародна студентська науково-практична конференція, м. Київ, 19–20 червня 2016 року: тези доповіді. К., 2016. С. 39–40. *(Здобувачем проведено визначення вмісту флавоноїдів в бджолиному обніжжі, здійснено аналіз результатів, підготовлено матеріали до друку).*

11. Галатюк О. Є., Ревунець А. С., **Застулка О. О.** Проблеми та перспективи розвитку пасічницьких фермерських господарств в Україні. Роль аграрних вищих навчальних закладів у розвитку малих форм господарювання як фактора соціально-економічної стабільності сільських територій та самозайнятості населення: Міжнародна науково-практична конференція, м. Київ, 23 листопада 2016 року: тези доповіді. К., 2016. С. 12–15. *(Здобувачем проведено збір та аналіз огляду літератури, підготовлено матеріали до друку).*

12. **Застулка О. О.**, Якубчак О. М. Найпоширеніші гриби-контамінанти бджолиного обніжжя України. Актуальні проблеми ветеринарної медицини: XVI Міжнародна науково-практична конференція професорсько-викладацького складу, аспірантів і студентів, м. Київ, 19–20 квітня 2017 року: тези доповіді. К., 2017. С. 60–61. *(Здобувачем проведено мікологічні дослідження бджолиного обніжжя, здійснено аналіз результатів, підготовлено матеріали до друку).*

13. **Застулка О. О.** Порівняльна характеристика вимог щодо фізико-хімічних показників бджолиного обніжжя в Україні та зарубіжних країнах. Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин: щорічна науково-практична конференція молодих вчених, м. Київ, 22 червня 2017 року: тези доповіді. К., 2017. С. 27–29.

14. Галатюк О. Є., Ревунець А. С., Солодка Л. О., Рибачук Ж. В., Романишина Т. О., Тушак С. Ф., Лемешинська Л. Ф., Якубчак О. М., **Застулка О. О.** Епізоотологічний моніторинг хвороб бджіл та основи підвищення рентабельності пасік. Епізоотологія, здоров'я та добробут тварин. Виклики сучасності: Міжнародна науково-практична конференція, м. Київ, 12 вересня 2017 року: тези доповіді. К., 2017. С. 70–73. *(Здобувачем проведено фізико-хімічні дослідження, здійснено статистичну обробку результатів, частково підготовлено матеріал до друку).*

15. Труш М. В., **Застулка О. О.**, Галатюк О. Є. Якість бджолиного обніжжя та профілактика вароатозу. Наукові здобутки студентської молоді у ветеринарії: науково-практична конференція магістрів та бакалаврів,

м. Житомир, 29 січня 2018 року: тези доповіді. Житомир, 2018. Вип. 9. С. 97–100. (Здобувачем проведено дослідження якості бджолиного обніжжя, здійснено аналіз результатів, підготовлено матеріал до друку).

16. Якубчак О. М., Застулка О. О. Моніторинг мікологічної безпеки бджолиного обніжжя. Контроль безпеки харчових продуктів у ЄС: Міжнародна науково-практична конференція, м. Київ, 19–20 квітня 2018 року: тези доповіді. К., 2018. С. 103–104. (Здобувачем проведено мікологічні дослідження, здійснено статистичну обробку та аналіз результатів, підготовлено матеріал до друку).

АНОТАЦІЯ

Застулка О. О. Мікологічна безпека та якість бджолиного обніжжя. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.09 «Ветеринарно-санітарна експертиза». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2019.

Представлено результати органолептичних, фізико-хімічних і мікробіологічних досліджень бджолиного обніжжя з різних регіонів України за 2013–2016 рр. Створено карту-схему якості бджолиного обніжжя України. Експериментально обґрунтовано використання підкислених (з величиною рН 4,5–5,0) агарів Чапека чи Сабуро для вирощування та підрахунку колоній мікроскопічних грибів, а також застосування агару Чапека та суспензії обніжжя у розведенні 1:10 для виявлення грибів роду *Fusarium*. З метою визначення видів мікроскопічних грибів пропонується використовувати агар МакКонкі для одночасного виявлення ентеробактерій та грибів-нейтрофілів. Вивчено структуру мікроскопічних грибів-контамінантів бджолиного обніжжя України, показано домінування видів *Aspergillus niger* Tiegh., *A. fumigatus* Fresen., *A. flavus* Link., *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., *Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl., *Mucor hiemalis* Wehmer.

Запропоновано розводити бджолине обніжжя медом в 9 разів, що достовірно ($p < 0,01$) знижує вміст грибів у 7,9 раза, а розведення в 19 разів зумовлює достовірне ($p < 0,01$) зниження мікроскопічних грибів у 13,9 раза. У разі контамінації обніжжя мікроскопічними грибами родів *Mucor* та *Rhizopus* його безпека можна забезпечити шляхом опромінення інфрачервоними променями впродовж години, завдяки чому знизиться обсіменіння бджолиного обніжжя даними грибами на 22,6 %.

Ключові слова: бджолине обніжжя, квітковий пилок, мікроскопічні гриби, якість, безпека.

АННОТАЦИЯ

Застулка О. А. Микологическая безопасность и качество пчелиной обножки. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.09 «Ветеринарно-санитарная экспертиза».

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев, 2019.

Представлены результаты органолептических, физико-химических и микробиологических исследований пчелиной обножки из разных регионов Украины за 2013–2016 гг. Было установлено, что массовая доля воды в пчелиной обножке составляет $8,77 \pm 0,2$ %. Определение рН 161 пробы пчелиной обножки показало, что у 64 (39,8 %) пробах величина рН отклонялась от нормы, определенной действующим национальным стандартом в сторону повышения, и в целом составила $5,32 \pm 0,22$. Содержание массовой доли флавоноидных соединений в пчелиной обножке составляло по Украине $5,43 \pm 1,08$ %, причем значительное содержание (от 5,5 % и более) выявлено в обножке из Винницкой, Закарпатской, Житомирской, Николаевской, Сумской, Хмельницкой и Черниговской областей. Определение окисляемости обножки, собранной в 2013–2016 гг. позволило установить, что во всех 100 % проб она соответствовала требованиям действующего стандарта. Учитывая полученные результаты, необходимо отметить, что окисляемость не имеет веского информативного значения для высушенной пчелиной обножки. Среднеарифметический показатель сырого протеина составляет $19,26 \pm 1,61$ %. В областях, где занижен данный показатель, отмечается тенденция к отклонению величины рН от нормы действующего стандарта в сторону повышения. Показано, что на рынок Украины ежегодно поставляется 21–37 % качественного продукта по физико-химическим показателям в соответствии с действующим национальным стандартом.

При проведении микробиологических исследований пчелиной обножки было установлено, что контаминация бактериями находится в пределах допустимого уровня, а контаминация микроскопическими грибами превышает допустимый уровень в 3–5 раз. При анализе микологических высевов пчелиной обножки 2013 г. сбора было выявлено, что нормативный подсчет количества колоний микроскопических грибов на 7–10 сутки для обножки неприемлем, поскольку чашки Петри полностью зарастают микроорганизмами и нет возможности для их подсчета. Для установления оптимального времени с целью подсчета микроорганизмов был проведен эксперимент, в котором первый подсчет колоний осуществляли через 16 часов, а затем – каждые 4 часа до 56 часов после посева. Появление гифов, которые можно увидеть невооруженным глазом и развитие отдельных колоний начинается уже на 28–32 часа. На 5 сутки на агаре Чапека процент спороношений составлял 45,2–75 %, а на агаре Сабуро – 30–62,5 %. Такая же тенденция была обнаружена в пробах обножки 2015 г. сбора. Таким образом, для изучения загрязнения пчелиной обножки микроскопическими грибами можно использовать агар Чапека или Сабуро. Однако, во время роста микроскопических грибов с пчелиной обножки на этих средах выявлена особенность, что в первые 2 суток активно разрастаются мукоральные грибы, которые мешают проведению количественного учета грибов и исследованию выделенных изолятов. Поэтому были проведены экспериментальные исследования по снижению величины рН среды для лучшей идентификации

микроскопических грибов. По требованиям действующего стандарта для пчелиной обножки величина рН питательных сред для выращивания грибов должна быть на уровне 5,5–6,0. На протяжении всех лет использование сред с такой величиной рН приводило к образованию колоний значительного диаметра (3–4 см), способных к быстрому диффузному росту, а также к стремительному развитию в посевах мукоральных грибов. Поэтому проведена оптимизация величины рН в питательных средах для выращивания микроскопических грибов. Установлено, что снижение рН до 4,5–5,0 в ростовых средах Чапека и Сабуро способствует подавлению прорастания мукоральных грибов и позволяет ускорить выявление других микроскопических грибов, которые могут представлять опасность для здоровья людей и животных.

В пробах пыльцы отмечено значительную контаминацию микроскопическими грибами рода *Fusarium*, поэтому было проведено определение содержания этих микроскопических грибов в пчелиной обножке с целью оценки ее безопасности. В 2015 г. в обножке было обнаружено 13–85 колониобразующих единиц микроскопических грибов *F. solani*, а в 2016 г. – от 15 до 65 колониобразующих единиц. Полученные колонии характеризовались клочковатой, паутинной структурой поверхности, неровным краем, желтоватым цветом центральной части, часто – бело-розовой, иногда – желто-зеленой периферией, интенсивной желто-красной пигментацией питательной среды вокруг молодых колоний или красно-коричневой – вокруг зрелых. Гифы под разными углами уходят от основной нитевидной клетки, а микроконидии имеют шаровидную или эллиптическую форму и чаще всего расположены не группами, а поодиночке. Сопоставление полученных препаратов с микрофотографиями других исследователей позволяет предположить, что выделенные изоляты относятся к виду *F. solani*. При проведении посевов пчелиной обножки на среде МакКонки были выделены и идентифицированы такие виды мицелиальных грибов: *Aspergillus niger* Tiegh., *A. fumigatus* Fresen., *A. flavus* Link., *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., *Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl. и *Mucor hiemalis* Wehmer. Общее количество микроскопических грибов в пчелиной обножке в исследованных областях Украины колеблется в пределах от 80 до 1200 колониобразующих единиц.

Проведенные эксперименты по снижению загрязнения пчелиной обножки микроскопическими грибами позволили констатировать, что измельчение на электрической мельнице, трехразовое замораживание и размораживание пчелиной обножки не дает возможности существенно уменьшить содержание микроскопических грибов. Разведение в 9 раз пчелиной обножки медом достоверно ($p < 0,01$) снижает содержание грибов в 7,9 раза, а разведение в 19 раз вызывает достоверное ($p < 0,01$) снижение микроскопических грибов в 13,9 раза. В случае контаминации обножки микроскопическими грибами родов *Mucor* и *Rhizopus* его безопасность можно обеспечить путем облучения инфракрасными лучами в течение часа, благодаря чему снижается обсеменение пчелиной обножки данным грибами на 22,6 %.

Ключевые слова: пчелиная обножка, цветочная пыльца, микроскопические грибы, качество, безопасность.

ANNOTATION

Zastulka O. O. Mycological Safety and Quality of Bee Pollen. – The Manuscript.

The thesis is submitted for the scientific degree of the candidate of veterinary sciences on specialty 16.00.09 «Veterinary and Sanitary Examination». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2019.

The results of organoleptic, physicochemical and microbiological researches of bee pollen from different regions of Ukraine are presented for 2013–2016 years. A map of bee pollen's quality was created. The use of acidified (pH 4.5–5.0) Chapek or Sabouraud agar for cultivation and counting of microscopic fungi colonies was experimentally substantiated, as well as the use of Chapek's agar and pollen suspensions at the dilution of 1:10 for detecting fungi of the genus *Fusarium*. In order to determine the types of microscopic fungi, it is proposed to use McConkey agar for the simultaneous detection of enterobacteriaceae and fungi. The structure of microscopic fungi of bee pollen of Ukraine was studied, as well as the dominant species of it. They are *Aspergillus niger* Tiegh., *A. fumigatus* Fresen., *A. flavus* Link., *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., *Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl., *Mucor hiemal* Wehmer.

It is suggested to mix bee pollen with honey in 9 times, which significantly reduces the content of fungi by 7.9 times ($p < 0.01$), and dilution in 19 times – causes reliable reduction of microscopic fungi in 13.94 times ($p < 0.01$). In the case of contamination of obscenity with microscopic fungi of genera *Mucor* and *Rhizopus*, its safety can be increased by irradiation with infrared rays for 1 hour, which will reduce the contamination of bee pollen with the fungi by 22.6 %.

Key words: bee pollen, flower pollen, microscopic fungi, quality, safety.

Підписано до друку 16.05.19
Ум. друк. арк. 0,9
Наклад 100 прим.

Формат 60x84\16
Обл.-вид.арк. 0,9
Зам. № 190398

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041
тел.: 527-81-55

