

**ВПЛИВ ДЖЕРЕЛ АЗОТНОГО ЖИВЛЕННЯ НА НАКОПИЧЕННЯ БІОМАСИ ТА ФУНГІСТАТИЧНУ АКТИВНІСТЬ *TRICHODERMA LIGNORUM* KMB-F-14**

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара (м. Дніпро)

Rita289616@gmail.com

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Виконана робота є частиною науково-дослідної роботи, що проводиться на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара у межах теми «Перспективні для використання людиною біологічні властивості мікроорганізмів – компонентів природних і штучних біоценозів» (№ державної реєстрації 0118U003277).

**Вступ.** Стабільне і продуктивне функціонування сучасних агроєкосистем можливе тільки за надання особливої уваги проблемі захисту рослин від збудників хвороб, шкідників та бур'янів, життєдіяльність яких призводить до значних втрат урожаю [1]. Протягом тривалого періоду в практиці сільськогосподарського виробництва перевагу віддавали хімічному методу захисту рослин. Однак тривале і постійно зростаюче застосування пестицидів негативно впливає на екологічні системи: призводить до забруднення навколишнього середовища, поширення стійких штамів і популяцій патогенів та шкідників, частота виникнення яких випереджає створення нових препаратів [2].

Враховуючи негативні наслідки застосування хімічних засобів захисту рослин, актуальною є розробка екологічно безпечних біологічних методів контролю збудників хвороб, у тому числі, препаратів на основі мікроорганізмів, що підвищують стійкість рослин до хвороб і проявляють антагоністичні властивості до фітопатогенів [3]. У цьому контексті становить інтерес впровадження в практику рослинництва мікробних препаратів, що мають широкий спектр фунгіцидної дії. До таких засобів слід віднести препарати на основі штамів ґрунтових мікроміцетів, зокрема, грибів роду *Trichoderma*, які проявляють антагоністичні властивості по відношенню до фітопатогенних мікроорганізмів [4].

При розробці біопрепаратів велике значення має підбір поживних середовищ для культивування штамів-продуцентів, які забезпечують максимальний приріст біомаси і високу антагоністичну активність [5].

**Мета дослідження** – визначити вплив різних джерел азотного живлення на накопичення біомаси гриба *Trichoderma lignorum* KMB-F-14 та його антагоністичні властивості по відношенню фітопатогенних грибів роду *Fusarium*.

**Об'єкт і методи досліджень.** Об'єктом дослідження були накопичення біомаси в умовах глибокого культивування та фунгістатична дія штаму *T. lignorum* KMB-F-14, виділеного із чорнозему звичайного.

Різні азотвмісні сполуки вносили у кількості 0,5 % до поживного середовища, що містило 0,5 % фосфорнокислого калію, 0,2 % сірчанокислого магнію та 2 % глюкози. Засів здійснювали суспензією конідій з титром  $1 \times 10^6$  у кількості 5 % від об'єму середовища. Культивували упродовж 72 годин на мікробіологічній качалці (200 об/хв) при 27-28 °С.

Вплив джерел азоту на ріст гриба оцінювали за виходом сухої біомаси ваговим методом [6]. Фунгістатичну активність мікроміцетів-антагоністів по відношенню до тест-культур *F. culmorum* IMB-F-50716 і *F. monileforme* KMB-F-23 визначали методом агарових блоків у модифікації М.В. Соколової і Г.В. Калько [7]. Фільтрати культуральних рідин після вирощування *T. lignorum* у середовищах з різними сполуками азоту, в кількості 5 % додавали до агаризованого середовища Чапека, на поверхню якого поміщали блок із міцелієм гриба-паразита. Визначали відсоток інгібування росту фітопатогенів порівняно з контролем (середовище без фільтрату).

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою комп'ютерних програм Statistica 6 та Microsoft Excel. Визначали середнє арифметичне та помилку середнього арифметичного.

**Результати досліджень та їх обговорення.** В результаті проведених досліджень було встановлено, що гриб *T. lignorum* здатний засвоювати різні джерела азоту. Як видно з наведених даних у **таблиці 1**, гриб здатний засвоювати неорганічні джерела азоту у вигляді нітратного та амонійного азоту. Найбільше біомаси було отримано при використанні амонія азотокислого – 4,2 г/л. Інші перевірені джерела неорганічного азоту давали менший приріст біомаси (від 1,32±0,63 до 3,39±0,72 г/л).

Органічні джерела азоту забезпечували приріст біомаси на порядок більший, ніж неорганічні. Із перевірених азотовмісних сполук найбільше біомаси було отримано у середовищі з дріжджовим автолізатом – 40,01±0,53 г/л сухої біомаси, що у 10 разів більше, ніж при використанні найкращого джерела мінерального азоту.

Хороші результати дало використання кукурудзяного екстракту та L глутамінової кислоти (28,1±0,8 і 24,09±0,8 г/л, відповідно). Приріст біомаси був у середньому в 1,5 рази менше, ніж у середовищі з дріжджовим автолізатом, але в 6-7 разів більше, ніж у середовищі з амонієм азотнокислим. Було також з'ясовано, що L аргінін солянокислий гірше засвоюється, ніж глутамінова кислота та інші джерела органічного азоту.

Згідно даних літератури [8], при порівнянні в якості джерел азоту нітрату калію, нітрату натрію та

**Таблиця 1.** Вплив азотних сполук на ріст штаму *Trichoderma lignorum* KMB-F-14 за глибинного культивування (n=3)

Азотні сполуки	Джерела азоту	Біомаса, г/л
Нітратний азот	Натрій азотнокислий NaNO <sub>3</sub>	2,79±0,19
	Калій азотнокислий KNO <sub>3</sub>	1,32±0,63
Нітратний та амонійний азот	Амоній азотнокислий NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	4,2±0,01
	Амоній хлористий NH <sub>4</sub> Cl	3,39±0,72
Амонійний азот	Амоній сірчаноокислий (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,37±0,82
	Автолізат дріжджів	40,01±0,53
Складні органічні джерела азоту	Кукурудзяний екстракт	28,1±0,8
	L глутамінова кислота	24,09±0,8
Моноамінодикарбонові амінокислоти	L аргінін солянокислий	7,39±0,71

сульфату амонію, найбільше біомаси гриба накопичувалося у середовищі з амонієм. З органічних джерел азоту придатними для вирощування гриба було запропоновано L глутамінова кислота, L аспаргінова кислота та L аланін [9]. Отримані нами дані співпадають з вказаними результатами досліджень, а саме із неорганічних джерел азоту перевагу слід віддати амонійним солям при культивуванні в рідкому середовищі для накопичення біомаси *T. lignorum* KMB-F-14. Що стосується органічних джерел азоту, то високий вихід біомаси спостерігався при використанні глутамінової кислоти, як і у вище наведених даних літератури.

Таким чином, найбільш сприятливими для росту гриба за результатами наших досліджень виявилися органічні джерела азоту: дріжджовий автолізат, кукурудзяний екстракт та глутамінова кислота.

Відомо, що синтез фунгістатичних та фунгіцидних речовин антагоністами може залежати від складу поживних середовищ та умов їх культивування [10], тому на наступному етапі нашої роботи було проведено визначення впливу різних джерел азотного

**Таблиця 2.** Фунгістатична активність фільтратів культуральних рідин штаму *Trichoderma lignorum* KMB-F-14 по відношенню до фітопатогенних грибів *Fusarium moniliforme* KMB-F-23 (n=3)

Джерела азоту у середовищі	Діаметр колонії, мм 3 доба	Інгібування росту, % 3 доба	Діаметр колонії, мм 6 доба	Інгібування росту, % 6 доба
Контроль	39,2±4,1		69,8±1,6	
Амоній азотнокислий	25,3±4,7	26	51,6±2,3*	35
Амоній хлористий	27,2±2,1	31	55,3±2,8*	58
Амоній сірчаноокислий	22,6±1,9*	42	29,3±0,9	58
Автолізат дріжджів	25,3±6,0	35	35,1±1,2	49
Калій азотнокислий	27,8±3,9	29	38,8±1,17*	44
Натрій азотнокислий	21,1±0,7*	46	25,1±0,21*	64
Кукурудзяний екстракт	23,5±2,1	40	28,5±1,13	59
Глутамінова кислота	18,2±0,21*	53	42,5±0,28	39
Аргінін солянокислий	23,2±0,21*	40	24,5±0,7	64

Примітка: \* – різниці достовірні у порівнянні з контролем – ростом гриба за відсутності культуральних рідин мікроорганізмів у середовищі (P < 0,05).

кислим та дріжджовим автолізатом.

Слід зазначити, що інгібування росту *F. moniliforme* проявлялось вже на 3 добу культивування, на 6 добу воно посилювалося.

Що стосується пригнічення росту іншого фітопатогена, то в цілому усі фільтрати показали більший відсоток інгібування *F. culmorum* порівняно з *F. moniliforme* (табл. 3). Найбільше пригнічення росту спостерігалось при вирощуванні триходерми у середовищах з калієм азотнокислим, аргініном і дріжджовим автолізатом. Високий відсоток інгібування відмічено при використанні глутамінової кислоти, амонію сірчаноокислого та кукурудзяного екстракту. Різниці між впливом джерел органічного та неорганічного азоту не виявлено.

Несподівано високим виявився рівень інгібування росту грибів роду *Fusarium* культуральною рідиною досліджуваного штаму при вирощуванні у середовищі з натрієм азотнокислим. Як зазначалося вище, вихід біомаси гриба у цьому середовищі був невисоким. Це підтверджує відомий факт, що одні й ті ж компоненти середовища

Джерела азоту у середовищі	Діаметр колонії, мм 3 доба	Інгібування росту, % 3 доба	Діаметр колонії, мм 6 доба	Інгібування росту, % 6 доба
Контроль	34,2±2,1		90,8±3,5	
Амоній азотнокислий	25,3±3,2*	26	50,3±4,9*	45
Амоній хлористий	24,9±4,5*	27	32,7±1,0*	64
Амоній сірчаноокислий	19,9±0,5*	41	29,5±1,6	68
Автолізат дріжджів	17,1±8,2	50	25,8±4,7	71
Калій азотнокислий	14,2±3,1	58	22,4±2,2*	75
Натрій азотнокислий	13,1±4,5	61	33,2±1,2*	63
Кукурудзяний екстракт	26,9±2,7*	21	30,1±2,7	67
Глутамінова кислота	21,5±2,0*	37	28,0±5,5	69
Аргінін солянокислий	29,5±2,7*	13	24,5±5,9	73

Примітка: \* – різниці достовірні у порівнянні з контролем – ростом гриба за відсутності культуральних рідин мікроорганізмів у середовищі (P < 0,05).

можуть по різному впливати на вихід біомаси та на синтез екзометаболітів.

Узагальнюючи результати проведених досліджень, можна заключити, що до складу поживних середовищ для культивування штаму *T. lignorum* KMB-F-14 з метою отримання препарату проти фітопатогенних грибів роду *Fusarium* у якості джерел азоту доцільно включати аргінін солянокислий, кукурудзяний екстракт, дріжджовий автолізат, амоній сірчаноокислий або амоній хлористий.

## Висновки

1. Проведено підбір джерел азотного живлення для глибинного культивування *Trichoderma lignorum* KMB-F-14. Показано, що найбільш сприятливими для накопичення біомаси є органічні джерела азоту: кукурудзяний екстракт та дріжджовий автолізат. Най-

більше біомаси отримано на середовищі з дріжджовим автолізатом – 40,01 г/л сухої біомаси.

2. Показано, що фунгістатична активність досліджуваного штаму *Trichoderma lignorum* KMB-F-14 залежить від джерела азоту у середовищі культивування. Встановлено високий відсоток інгібування росту *F. monileforme* KMB-F-23 (58–64%) і *F. culmorum* IMB-F-50716 (63–73%) при використанні аргініну, кукурудзяного екстракту, дріжджового автолізату, амонію сірчаноокислого, амонію хлористого та натрію азотноокислого у якості джерела азотного живлення.

**Перспективи подальших досліджень.** Отримані експериментальні дані представляють практичний інтерес, оскільки вони можуть бути використані для розробки технології виробництва біологічних засобів захисту рослин від фітопатогенних бактерій та грибів на основі *Trichoderma lignorum* KMB-F-14.

## Література

1. De Palma M, D'Agostino N, Proietti S. Suppression Subtractive Hybridization analysis provides new insights into the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) response to the plant probiotic microorganism *Trichoderma longibrachiatum* MK1. *Plant Physiol.* 2016;190:79-94.
2. Prabhakaran N, Prameeladevi T, Sathiyabama M. Screening of different *Trichoderma* species against agriculturally important foliar plant pathogens. *J. Environ. Biol.* 2015;36(1):191-8.
3. Ruocco M, Lanzuise S, Lombardi N. Multiple roles and effects of novel *Trichoderma hydrophobin*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2015;28(2):167-79.
4. Ibrahim SRM, Abdallah HM, Elkhayat ES. Fusaripeptide A new antifungal and anti-malarial cyclodepsipeptide from the endophytic fungus *Fusarium* sp. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2017;27:1-11.
5. Asad SA, Ali N, Hameed A. Biocontrol efficacy of different isolates of *Trichoderma* against soil borne pathogen *Rhizoctonia solani*. *Pol. J. Microbiol.* 2014;63(1):95-103.
6. Vinale F, Nigro M, Sivasithamparam K, Flematti G, Ghisalberti EL, Ruocco M, et al. Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett.* 2013;347:123-9.
7. Smirnov OV, Grishechkina SD. Izuchenie deystviya biopreparatov na osnove *Bacillus thuringiensis* na fitopatogenyie gribyi. *Vestnik zashchity rasteniy.* 2010;1:27-35. [in Russian].
8. Mehta J. Impact of Carbon & Nitrogen Sources on the *Trichoderma viride* (Biofungicide) and *Beauveria bassiana* (entomopathogenic fungi). *European Journal of Experimental Biology.* 2012;2(6):2061-7.
9. Ziganshin DD, Sirotkin AS. Osobennosti glubinnogo i poverhnostnogo kultivirovaniya gribov *Trichoderma* dlya polucheniya biopreparatov na osnove kletok griba. *Vestnik tehnologicheskogo universiteta.* 2017;20(10):155-8. [in Russian].
10. Bilyavska LO, Koziritska VE, Valagurova OV, Iutinska GO. Vpliv piruvatu i valinu na biosintez avermektinu *Streptomyces avermitilis* UKM As-2179. *Mikrobiol. zhurn.* 2007;69(4);10-7. [in Ukrainian].

## ВПЛИВ ДЖЕРЕЛ АЗОТНОГО ЖИВЛЕННЯ НА НАКОПИЧЕННЯ БІОМАСИ ТА ФУНГІСТАТИЧНУ АКТИВНІСТЬ *TRICHODERMA LIGNORUM* KMB-F-14

Железняк М. Ю., Дрегваль О. А., Черевач Н. В., Скляр Т. В.

**Резюме.** Зроблено підбір джерел азотного живлення для культивування штаму гриба *Trichoderma lignorum* KMB-F-14; досліджено вплив сполук азоту на накопичення біомаси та фунгістатичну дію *Trichoderma lignorum* KMB-F-14 проти фітопатогенних грибів роду *Fusarium* при вирощуванні у середовищах з різними джерелами азотного живлення. Показано, що найбільш сприятливими для накопичення біомаси є органічні джерела азоту: кукурудзяний екстракт та дріжджовий автолізат. Найбільше біомаси отримано на середовищі з дріжджовим автолізатом – 40,01 г/л.

Фунгістатична активність досліджуваного штаму *Trichoderma lignorum* KMB-F-14 залежала від джерела азоту в середовищі культивування. Встановлено високий відсоток інгібування росту *F. monileforme* KMB-F-23 (58-64%) і *F. culmorum* IMB-F-50716 (63-73%) при використанні аргініну, амонію сірчаноокислого, натрію азотноокислого і амонію хлористого у якості джерела азоту.

**Ключові слова:** мікроміцети, *Trichoderma*, антагонізм, фітопатогени, накопичення біомаси.

## ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКОВ АЗОТНОГО ПИТАНИЯ НА НАКОПЛЕНИЕ БИОМАССЫ И ФУНГИСТАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ *TRICHODERMA LIGNORUM* KMB-F-14

Железняк М. Ю., Дрегваль О. А., Черевач Н. В., Скляр Т. В.

**Резюме.** Сделан подбор источников азотного питания для культивирования штамма гриба *Trichoderma lignorum* KMB-F-14; исследовано влияние соединений азота на накопление биомассы и фунгистатическое действие *Trichoderma lignorum* KMB-F-14 против фитопатогенных грибов рода *Fusarium* при выращивании на средах с различными источниками азотного питания. Показано, что наиболее благоприятными для накопления биомассы являются органические источники азота: кукурузный экстракт и дрожжевой автолизат. Наибольшее количество биомассы получено на среде с дрожжевым автолизатом – 40,01 г/л.

Фунгистатическая активность исследованного штамма *Trichoderma lignorum* KMB-F-14 зависела от источника азота в среде культивирования. Установлен высокий процент ингибирования роста *F. monileforme* KMB-F-23 (58-64%) и *F. culmorum* IMB-F-50716 (63-73%) при использовании аргинина, аммония серноокислого, натрия азотноокислого и аммония хлористого в качестве источника азота.

**Ключевые слова:** микромицеты, *Trichoderma*, антагонизм, фитопатогены, накопление биомассы.

## INFLUENCE OF NITROGEN FEED SOURCES ON BIOMASS ACCUMULATION AND FUNGISTATIC ACTIVITY OF *TRICHODERMA LIGNORUM* KMB-F-14

Zhelezniak M. Y., Drehval O. A., Cherevach N. V., Sklyar T. V.

**Abstract.** The widespread use of chemical pesticides in agriculture has led to the pollution of environmental systems and has caused various health disorders in animals and humans. Biological pest control is one of the most environmentally friendly methods in modern agriscience. Such methods protect crops from pests and do not pollute the environment.

Some terrestrial *Trichoderma sp.* strains are already used as biological control agents. They all produce peptaibols, small antimicrobial peptides which are supposed to play a role in the anti-phytopathogenic activity of *Trichoderma sp.*

The aim of the study was to determine the influence of various sources of nitrogen on the accumulation of biomass of *Trichoderma lignorum* KMB-F-14 and its antagonistic properties against phytopathogenic fungi of the genus *Fusarium*.

The object of the study was the accumulation of biomass in conditions of deep cultivation and the fungistatic action of strain *T. lignorum* KMB-F-14, isolated from ordinary black earth.

Various nitrogen-containing compounds were introduced in an amount of 0.5% to a nutrient medium containing 0.5% potassium phosphorus, 0.2% magnesium sulfate and 2% glucose. Sowing was carried out by a suspension of conidia with a titre of  $1 \times 10^6$  in an amount of 5% of the volume of the medium. Cultivated for 72 hours on a microbiological rocker (200 rpm) at 27-28°C. The influence of nitrogen sources on the growth of the fungus was estimated at the exit of dry biomass by weight method. Fungistatic activity of micromycetes-antagonists in relation to test cultures *F. culmorum* IMB-F-50716 and *F. monileforme* KMB-F-23 were determined by the method of agar blocks in the modification.

As a result of the studies, it was found that *T. lignorum* fungus is capable of absorbing various sources of nitrogen. As can be seen from the data presented, the fungus is capable of absorbing inorganic nitrogen sources in the form of nitrate and ammonia nitrogen.

It is known that the synthesis of fungistatic and fungicidal substances by antagonists may depend on the composition of the nutrient medium and the conditions for their cultivation, therefore, in the next stage of our work, the effect of different sources of nitrogen feed on the antagonistic activity of *Trichoderma lignorum* KMB-F-14 against fungi was performed of *Fusarium spp.*

Selection of sources of nitrogen feed for cultivating strain of *Trichoderma lignorum* KMB-F-14. The influence of nitrogen compounds on the accumulation of biomass and the fungistatic effect of *Trichoderma lignorum* KMB-F-14 against phytopathogenic fungi of the genus *Fusarium* when grown on media with different sources of nitrogen nutrition have been investigated. It is shown that the most favorable for the accumulation of biomass are organic sources of nitrogen: corn extract and yeast autolysate. The greatest amount of biomass was obtained on medium with yeast autolysate – 40.01 g/l dry biomass.

The fungistatic activity of the strain *Trichoderma lignorum* KMB-F-14 depends on the source of nitrogen in the culture medium. A high percentage of fungal growth inhibitors of the genus *Fusarium* was found *F. monileforme* KMB-F-23 (58-64%) and *F. culmorum* IMB-F-50716 (63-73%) with arginine, ammonium sulfate, sodium nitroxide and ammonium chloride as a source of nitrogen.

**Key words:** micromycetes, *Trichoderma*, antagonism, phytopathogens, accumulation of biomass.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.

Стаття надійшла 15.12.2018 року

DOI 10.29254/2077-4214-2019-1-1-148-254-257

УДК 579.61

Надвернюк Р. А., Воронкова О. С., Франкенберг А. А., Шевченко Т. М.

## ЧУТЛИВІСТЬ ДО АНТИБІОТИКІВ КЛІНІЧНИХ ІЗОЛЯТІВ СТАФІЛОКОКІВ

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара (м. Дніпро)

voronkova\_olga@i.ua

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Дослідження виконані у рамках наукової теми «Моніторинг стану здоров'я населення Дніпропетровської області з аналізом клініко-лабораторних показників» (затверджена рішенням Вченої ради факультету медичних технологій діагностики та реабілітації, протокол №3 від 26.11.2018 р.).

**Вступ.** Стафілококова інфекція за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я продовжує повсюдно поширюватися з наростаючою динамікою. Захворювання зустрічаються у всіх вікових групах населення, починаючи з дитячого віку. Унікальність цих уражень полягає в тому, що вони здатні вражати всі органи і системи у вигляді локалізованих або генералізованих форм. Виділяють наступні нозоло-

гічні форми: хвороби шкіри та підшкірної клітковини, органів дихання, нервової системи та органів чуття, органів травлення, кістково-м'язової системи та сполучної тканини, кровообігу, сечостатевої системи, а також сепсис [1,2]. Ці особливості надають стафілококовій інфекції загальноклінічний характер, оскільки актуальні для фахівців різних напрямків: інфекціоністів, терапевтів, хірургів, педіатрів, дерматологів, неврологів і інших спеціалістів [3,4,5].

Особливо значення у проблемі стафілококових інфекцій набуває питання поширення стійкості до антибіотиків серед клінічних ізолятів, що опосередковує виникнення проблем при вживанні терапевтичних заходів. Стафілококи сьогодні визнані однією з найбільш значущих груп мікроорганізмів, які володі-