

УДК 579/631.461

МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНІ ТА ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ШТАМІВ МІКРОМІЦЕТІВ, ЩО ВХОДЯТЬ ДО СКЛАДУ АСОЦІАЦІЇ *TRICHODERMA HARZIANUM* 128

С. М. Деркач¹, М. В. М'ягка¹, В. В. Волкогон¹, Л. Т. Наконечна²,
С. Б. Дімова¹, Н. О. Кравченко¹, Н. В. Луценко¹

¹Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14035, Україна; e-mail: derkachsergiy888@gmail.com

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154; м Київ, 03143, Україна

Мета. Здійснити скринінг активних целюлозоруйнівних штамів мікроміцетів роду *Trichoderma*, дослідити їх морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості з метою подальшого використання при компостуванні органічних субстратів як деструктора соломи. **Методи.** Мікробіологічні, біохімічні, статистичні. **Результати.** З напіврозкладеної соломи виділено 150 ізолятів целюлозоруйнівних мікроскопічних грибів роду *Trichoderma*. Серед виділених ізолятів грибів найактивнішим впливом на руйнування целюлози характеризується асоціація мікроміцетів *Trichoderma* sp. 128. Компоненти асоціації (відповідно *Trichoderma* sp. 128/1 і *Trichoderma* sp. 128/2) відрізняються між собою характером росту на живильному середовищі, забарвленням колоній і целюлозоруйнівною активністю. За сумісного культивування компонентів асоціації в середовищі, де єдиним джерелом вуглецю є фільтрувальний папір або солома, спостерігається вищий ефект, ніж за їх роздільного вирощування. Селекціонована асоціація забезпечує ступінь розкладу соломи до 33 % протягом 21 доби, що перевищує активність відомого целюлозоруйнівного штаму *Trichoderma harzianum* F-2455. За морфолого-культуральними і фізіолого-біохімічними властивостями компоненти асоціації грибів ідентифіковані як *Trichoderma harzianum* 128/1 і *T. harzianum* 128/2 (відповідно асоціація — *Trichoderma harzianum* 128). За дослідження вірулентності мікроорганізмів на моделі білих мишей встановлено, що компоненти асоціації не патогенні для теплокровних тварин, це дозволяє використовувати асоціацію у виробництві. **Висновки.** Селекціоновано активну целюлозоруйнівну асоціацію мікроміцетів, що містить два штами. Асоціацію ідентифіковано як *Trichoderma harzianum* 128. Використання асоціації мікроміцетів може бути перспективним під час компостування органічної речовини з метою прискорення її мінералізації.

Ключові слова: розклад соломи, компостування, мікроміцети роду *Trichoderma*, асоціація *Trichoderma harzianum* 128.

Вступ. Останнім часом у багатьох країнах зростає зацікавленість до технології компостування птишиного посліду. Є значна кількість технологій, які відрізняються за характером ферментації органічної речовини, використанням додаткових компонентів, тривалістю технологічних процесів, якістю вихідної продукції [1–5]. Проте у більшості з цих технологій не враховано особливості мікробіологічних процесів, через що вони є багатостадійними та енергоємними і не до-

зволяють отримувати біоорганічні добрива високої якості. Іншим недоліком більшості технологій компостування є їхня тривалість. Причиною цього часто є те, що поширеним компонентом субстратів на основі птишиного посліду є солома, яка характеризується тривалою мінералізацією. Інтенсифікація розкладу соломи дозволить значно скоротити строки компостування органічної речовини. Важливим як для активізації розкладу соломи, так і для покращення якості кінцево-

го продукту, є компостування субстратів за участі активних целюлозоруйнівних штамів мікроорганізмів.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Одними з найбільш перспективних мікроорганізмів, здатних до активної мінералізації рослинних решток, є мікроміцети роду *Trichoderma* Pers. [6–8]. Вони володіють низкою властивостей, що дозволяє зарахувати їх до умовної групи агрономічно цінних мікроорганізмів. Застосування в технологіях компостування представників роду *Trichoderma* з метою прискорення процесу біоферментації органічного субстрату та покращення якісних показників отриманих компостів є поширеним заходом у багатьох країнах. Ефективність такого прийому підтверджується результатами, отриманими різними дослідниками. Так, співробітниками університету Аннамалая (Індія) показано можливість застосування як інтродуцентів до компостованих субстратів консорціуму лігнінолітичних грибів *Aspergillus niger* Tiegh., *Aspergillus flavus* Link, *Phanerochaete chrysosporium* Burds. та *Trichoderma viride* Pers. На думку авторів, застосування вищезазначених грибів дозволяє прискорити процес компостування органічних субстратів та покращити якість отримуваних компостів [3]. А. Берналь із співав. [9] стверджують, що додавання специфічних мікроорганізмів, таких як *Trichoderma harzianum* Rifai, до органічних субстратів прискорює процес компостування, а отримані компости зменшують захворюваність рослин, збільшують урожайність сільськогосподарських культур, але механізми дії таких біокомпостів та ефекти біоконтролю ще не повністю зрозумілі. Дж. Блейя пропонує додавати до компостованих субстратів гриби роду *Trichoderma* Pers. На прикладі інтродукції *T. harzianum* Rifai автор показує, що даний прийом суттєво впливає на структуру бактеріального угруповання компосту (відбувається зростання чисельності хітинолітичних бактерій) та дає можливість протидіяти розвитку фузаріозу [10].

Мета досліджень. Провести скринінг ефективних штамів целюлозоруйнівних мікроміцетів серед представників роду *Trichoderma* та вивчити їх морфолого-культуральні і фізіолого-біохімічні особливості.

Матеріали та методи досліджень. Ви-

ділення целюлозолітичних мікроміцетів здійснювали методом водних змивів з напіврозкладеної соломи [12]. Для визначення ефективності розкладання целюлозовмісних субстратів гриби культивували впродовж 21 доби в рідкому середовищі Чапека-Докса такого складу (g/dm^3): NH_4NO_3 — 2; K_2HPO_4 — 1,0; MgSO_4 — 0,5; KCl — 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; pH 4,5–5 [8]. Як єдине джерело вуглецю використовували пшеничну солому та фільтрувальний папір (1 % від маси). Після культивування рештки целюлозовмісного субстрату відділяли від культуральної рідини, висушували та розраховували відсоток деструкції за формулою [11]:

$$A = \left(1 - \frac{A_0 - A_1}{A_0}\right) \cdot 100,$$

де A — відсоток деструкції, %;

A_0 — початкова маса субстрату, г;

A_1 — кінцева маса субстрату, г.

У процесі відбору активних целюлозоруйнівних ізолятів грибів як позитивний контроль використовували відомий целюлозолітичний штам мікроміцетів — *Trichoderma harzianum* Rifai F-2455 (наданий Депозитарієм мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України).

Морфологічні властивості мікроміцетів вивчали за допомогою методу світлової мікроскопії, в т. ч. фазово-контрастним методом (Granum R 5002, Україна) за збільшення $\times 300$ та $\times 600$ через 3 доби інкубації на сусло-агарі за температури $+ 26^\circ\text{C}$ [12]. Фізіолого-біохімічні властивості грибів (засвоєння вуглеводів, здатність розріджувати желатин, коагулювати молоко, засвоювати амонійну і нітратну форми азоту, фосфорні сполуки) визначали за відповідними методиками [12]. Здатність мікроміцетів рости за температури $+ 35^\circ\text{C}$ вивчали на сусло-агарі [12].

Ідентифікацію грибів здійснювали за визначником А. В. Александрової [13].

З метою з'ясування можливої патогенності ізольованих штамів — представників роду *Trichoderma* — для теплокровних тварин досліджували один із показників патогенності — вірулентність культури мікроорганізму на моделі білих мишей [14–17]. Перевірку патогенних властивостей компонентів асоціації проводили з використанням безпородних статевозрілих білих мишей ма-

сою 18–20 г шляхом введення споро-міцеліальної суспензії грибів в ізотонічному розчині хлориду натрію перорально через зонд та внутрішньочеревно шляхом ін'єкцій. Для цього споро-міцеліальні суспензії грибів, що входять до складу асоціації, отримували при культивуванні впродовж 3 діб в аеробних умовах на сусло-агарі з масовою часткою сухих речовин 3,5 %, рН 7,0 за температури + 26 °С. Суспензії споро-міцеліальної суміші мікроміцетів готували на стерильному ізотонічному розчині хлориду натрію, інгредієнти якої попередньо двічі відмивали від метаболітів та осаджували шляхом центрифугування упродовж 20 хвилин за 2000 об./хв. Концентрацію колонієутворюючих одиниць (КУО) визначали шляхом їх підрахунку в камері Горяєва. Миші попередньо були адаптовані до умов утримання упродовж 14 діб. Догляд за тваринами проводили щоденно протягом 20 діб після введення досліджуваного матеріалу [16; 17].

Споро-міцеліальні суспензії грибів застосовували у дозах 1×10^6 , 1×10^7 та 1×10^8 КУО на одну тварину [16].

Усі досліді на тваринах проводили з урахуванням «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених на Національному конгресі з біоетики [15] з дотриманням міжнародних вимог Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» [19].

Вірулентність (що є загально визнаною умовною мірою патогенності) досліджуваної асоціації грибів встановлювали за рівнем дози життєздатних мікробних клітин, яка викликає загибель 50 % заражених тварин (LD_{50}). Критерієм авірулентності мікроорганізмів слугували відсутність інфекційної патології внутрішніх органів та загибелі мишей упродовж 20 діб [20].

Інфективність (інвазивність) асоціації мікроміцетів визначали шляхом встановлення можливості дисемінації клітин мікроорганізму у тканини внутрішніх органів тварин після зараження з моделюванням можливого природного шляху проникнення (*per os*) у макроорганізм [20].

Після закінчення терміну спостереження за поведінковими реакціями та фізіологічним станом мишей проводили їх вимушений забій, патологоанатомічний розтин, мікроско-

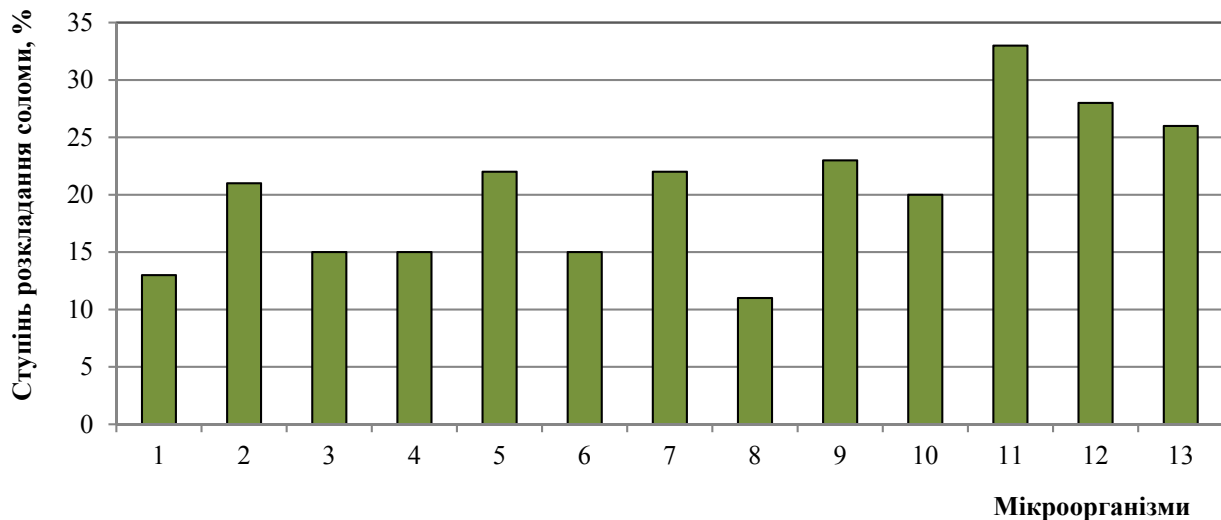
пічні дослідження мазків-відбитків внутрішніх органів та висіви зразків тканин на елективне живильне середовище [20].

Результати та їх обговорення. У ході досліджень виділено 150 ізолятів — представників роду *Trichoderma*, з яких відібрано 11 найактивніших. Порівнюючи з позитивним контролем (*T. harzianum* F-2455), 6 штамів виявили вищу (або на рівні) активність щодо розкладу соломи (рис. 1). Найактивнішою серед досліджених мікроміцетів виявилася асоціація *Trichoderma sp.* 128, яка забезпечує ступінь розкладу соломи на рівні 33 %, що на 12 % вище від аналогічного показника за дії *T. harzianum* F-2455. У досліді відзначено також незначне руйнування соломи в контрольному варіанті, що пояснюється впливом режимів автоклавування живильного середовища.

До активної асоціації мікроміцетів *Trichoderma sp.* 128 входять штами *Trichoderma sp.* 128/1 і *Trichoderma sp.* 128/2, які виявляють меншу деструктивну активність за окремого їх використання (рис. 1 і 2). За їх поєднаного застосування спостерігається зростання інтенсивності процесів мінералізації.

З метою видової ідентифікації компонентів асоціації грибів *Trichoderma sp.* 128 досліджували їхні морфолого-культуральні і фізіолого-біохімічні властивості. Активний ріст асоціації на живильному середовищі спостерігається вже на другий день. Міцелій спочатку білий, потім зеленішає. На 4–5-й день ріст стає інтенсивнішим і чашка Петрі заростає на 100 %, забарвлення набуває жовтого відтінку. На початку культивування *Trichoderma sp.* 128/1 розвивається інтенсивніше за *Trichoderma sp.* 128/2 і займає периферійне положення на чашці Петрі, а *Trichoderma sp.* 128/2 розвивається переважно в центрі чашки і на 4–5-й день за рівнем інтенсивності росту наближається до *Trichoderma sp.* 128/1 (рис. 3).

Отже, на 4–5-й день співвідношення штамів в асоціації становить приблизно 1 : 1. Також у *Trichoderma sp.* 128/1 відзначено початок спороношення на добу раніше ніж у *Trichoderma sp.* 128/2. Досліджувані штами мають відмінності за кольором. Так, *Trichoderma sp.* 128/1 має зелено-малахітове забарвлення, а *Trichoderma sp.* 128/2 — жовто-зелене. Колір зворотної сторони колоній є жовтим в обох ізолятів. Тож штами грибів від-



1 — Контроль (без мікроорганізмів), 2 — *T. harzianum* F-2455, 3 — *Trichoderma* sp. 26, 4 — *Trichoderma* sp. 124, 5 — *Trichoderma* sp. 140, 6 — *Trichoderma* sp. 158, 7 — *Trichoderma* sp. 130, 8 — *Trichoderma* sp. 127, 9 — *Trichoderma* sp. 147, 10 — *Trichoderma* sp. 122, 11 — *Trichoderma* sp. 128, 12 — *Trichoderma* sp. 128/1, 13 — *Trichoderma* sp. 128/2.

Рис. 1. Целюлозолітична активність грибів.

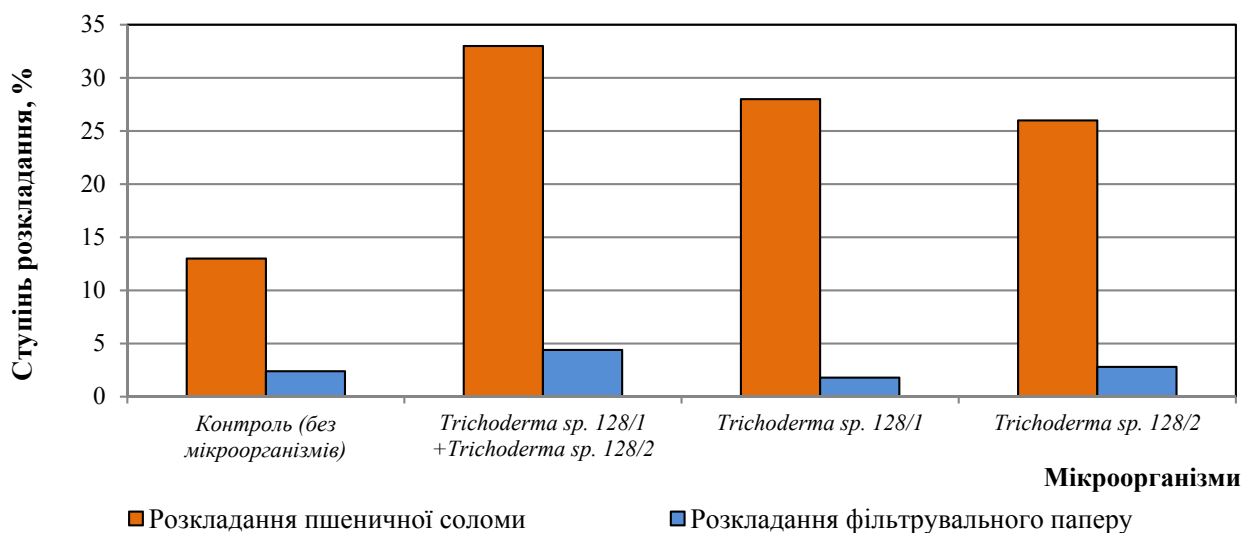


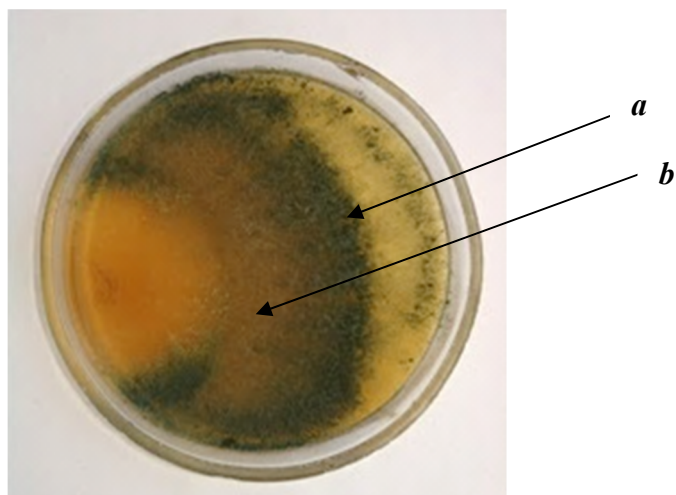
Рис. 2. Вплив застосування асоціації *Trichoderma* sp. 128 на розклад фільтрувального паперу та пшеничної соломи.

різняються за швидкістю росту, тобто швидкістю засвоювання субстрату, та мають деякі відмінності в забарвленні колоній (табл. 1).

Морфологічні особливості штамів, що входять до асоціації, подібні. Вони мають безбарвні, гладенькі, злегка звивисті конідієносці. Їх ріст деревоподібно розгалужений, через рівні проміжки, гілочки прямі чи дещо зігнуті, розходяться під прямим кутом до конідієносця. Фіаліди *Trichoderma* sp. 128/1 та *Trichoderma* sp. 128/2 розміщені на гілочках мутовками по 2–6 шт., ампулоподібної форми. Конідії дрібні, гладенькі, зібрані в голівки, округлі, від яйцеподібних до коротко-

еліптичних, зеленого забарвлення.

Штами *Trichoderma* sp. 128/1 та *Trichoderma* sp. 128/2 є аеробами. Засвоюють глюкозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, крохмаль, маніт. Желатин розріджують, молоко не коагулюють. Засвоюють амонійну і нітратну форми азоту, різноманітні фосфорні сполуки та однозаміщений фосфорнокислий калій. Штами грибів, які входять до асоціації, резистентні до пеніциліну та стрептоміцину. Оптимальна температура для росту і біосинтезу целюлаз становить +26 ... +27 °С. Оптимальний рН живильних середовищ для росту і біосинтезу ферментів — 5,0–5,5.



a — *Trichoderma sp.* 128/1; *b* — *Trichoderma sp.* 128/2

Рис. 3. Ріст *Trichoderma sp.* 128/1 і *Trichoderma sp.* 128/2 на живильному середовищі.

Таблиця 1. Основні морфолого-культуральні особливості *Trichoderma sp.* 128/1 та *Trichoderma sp.* 128/2

Морфолого-культуральні властивості	Характеристика штамів	
	<i>Trichoderma sp.</i> 128/1	<i>Trichoderma sp.</i> 128/2
Активний ріст	на 2-й день	на 3-й день
Локалізація на чашці Петрі	периферія	центр
Радіус колоній на сусло-агарі на 3-у добу (за температури +26 °С)	43,5–50,0 mm	34,8–40,0 mm
Радіус колоній на сусло-агарі на 3-у добу (за температури +35 °С)	27,7–35,0 mm	22,7–28,0 mm
Мицелій	безбарвний, сланкий, ватоподібний	
Спороношення	на 3–4-й день росту	на 3–5-й день росту
Колір	зелено-малахітовий	жовто-зелений
Колір зворотньої сторони колоній	жовтий відтінок	
Пігмент у середовище	не виділяється	
Конідієносці:		
– колір	безбарвні	
– поверхня	гладенькі	
– форма	злегка звивисті	
– розмір	4,0–8,0 мкм у діаметрі	
– характер росту	деревоподібно розгалужені, через рівні проміжки, гілочки розташовані по дві-три, іноді по одній, прямі чи дещо зігнуті, розходяться під прямим кутом до конідієносця	
Фіаліди:		
– розміщення	на гілочках мутовками по 2–6, рідко по одній	
– форма	від ампулоподібних до яйцеподібних	
– розміри	широкі та короткі, роздуті в середині, 3,5–7,5 × 2,5–4,0 мкм, термінальні пляшкоподібні можуть бути більш витягнуті — до 10,0 мкм	
– шийка	витягнута вузька 0,5–2,0 мкм у довжину	
Конідії:		
– колір	зелені	
– форма	зібрані в голівки, округлі, від яйцеподібних до короткоеліптичних	
– розмір	дрібні 2,0–3,5 × 1,5–2,7 мкм	
– поверхня	гладенькі	

При довгостроковому зберіганні культуру утримують від 3 до 4 місяців на скошеному сусло-агарі 3–4° за Балінгом, рН 6,4–7,0, у холодильнику при +4 ... +6 °С, пересівають через 10–12 місяців. У сублімаційно-висушеному стані зберігають за температури +3 ... +4 °С упродовж кількох років. Культивують поверхнево на сусло-агарі 3–4° за Балінгом при рН 6,4–7,0 і температурі +26 ... +27 °С.

На основі вивчених морфолого-культуральних і фізіолого-біохімічних властивостей штами мікроміцетів, що входять до асоціації *Trichoderma sp.* 128, ідентифіковано як *T. harzianum* 128/1 та *T. harzianum* 128/2. Досліджувану асоціацію грибів депоновано у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного Національної академії наук України (м. Київ, Україна). Вона також зберігається в Національній колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН (м. Чернігів, Україна).

Не менш важливою особливістю мікроорганізмів є можлива їх патогенність. Рід *Trichoderma* не включено до переліку небезпечних біологічних об'єктів, які можуть інфікувати людей і тварин або бути для них токсичними чи алергічними чинниками. Проте з літератури відомо, що в окремих випадках представники роду *Trichoderma* можуть становити загрозу для здоров'я людини [18].

З метою з'ясування можливої патогенності досліджуваних штамів мікроміцетів для теплокровних тварин вивчали один із показників патогенності — вірулентність культури мікроорганізму на моделі білих мишей. За період спостереження після введення споро-міцеліальної суспензії грибів *T. harzianum* 128/1 та *T. harzianum* 128/2 перорально у дозах 1×10^6 , 1×10^7 та 1×10^8 КУО в 1 см^3 тварини добре поїдали корм, мали жвавий вигляд. Вірогідної різниці у масі та температурі тіла дослідних і контрольних тварин, а також у загальному стані організму та поведінці не виявлено. Середня летальна доза за перорального введення культури мікроміцетів *T. harzianum* 128/1 та *T. harzianum* 128/2 становить $\text{ЛД}_{50 \text{ per os}} > 1 \times 10^8$ КУО / мишу (табл. 2).

За внутрішньочеревних ін'єкцій споро-міцеліальної суспензії грибів *T. harzianum*

128/1 та *T. harzianum* 128/2, тварини упродовж періоду спостереження мали жвавий вигляд, блискучий хутряний покрив та добрий апетит. Різниця в масі та в температурі тіла, а також у загальному стані організму та поведінці дослідних і контрольних тварин не відзначали. Однак, при введенні споро-міцеліальної суспензії *T. harzianum* 128/1 на 4 та 9-у добу у дозах 1×10^8 та 1×10^7 КУО на мишу, а *T. harzianum* 128/2 — на 10 та 19-у добу у відповідних групах виявлено загибель тварин на рівні 20 % (по 1 миші) (табл. 2). Така кількість загинув тварин перебуває в межах показників авірулентності, оскільки досліджувані штами викликали загибель менше ніж 50 % тварин. Під час проведення патологоанатомічного розтину загинув тварин не встановлено видимих патологічних змін в усіх внутрішніх органах, крім печінки: поверхня та паренхіма органу була блідою кольору з наявністю крапчастих крововиливів.

Всі миші дослідних і контрольних груп, які залишилися живими після закінчення терміну спостереження, були вбиті, проведено їх розтин і дослідження внутрішніх органів. Результати розтину показали відсутність видимих змін у внутрішніх органах досліджуваних тварин.

Мікробіологічні дослідження внутрішніх органів дослідних тварин через 20 діб після початку досліджень засвідчили, що штами *T. harzianum* 128/1 та *T. harzianum* 128/2 не інфективні, не дисемінують і не розмножуються в організмі теплокровних. Внутрішньочеревне та пероральне введення суспензії живих клітин штамів не призвело до інвазії у внутрішні органи тварин, а ін'єкційно введені дози споро-міцеліальної суспензії грибів у макроорганізм елімінувалися упродовж 20 діб (строк спостереження).

Отримані результати свідчать про авірулентність штамів *Trichoderma sp.* 128/1 та *Trichoderma sp.* 128/2 для досліджених теплокровних тварин ($\text{ЛД}_{50 \text{ в/ч}} \geq 1 \times 10^8$ КУО / мишу, $\text{ЛД}_{50 \text{ per os}} > 1 \times 10^8$ КУО / мишу).

Отже, згідно з отриманими результатами та відповідними нормативними документами, штами *T. harzianum* 128/1 та *T. harzianum* 128/2 належать до групи авірулентних мікроорганізмів, не здатних до інвазії у внутрішні органи досліджених теплокровних тварин. Згідно з даними щодо відсутності вірулентності, без урахування рівнів токсич-

Таблиця 2. Результати дослідження вірулентності штамів асоціації *Trichoderma* sp. 128

Матеріал для введення	Кількість мишей, гол.	Доза		Спосіб введення	Курс введення, діб	Кількість мишей, гол.			% летальності
		см ³	млн. КУО			захворіло	вижило	загинуло	
Контроль (ізотонічний розчин)	5	1,0	0	в/ч ¹	1	0	5	0	0
	5	1,0	0	<i>per os</i> ¹	1	0	5	0	0
Споро-міцеліальна суспензія <i>T. harzianum</i> 128/1	5	1,0	100,0	в/ч	1	1	4	1 ²	20
	5	1,0	10,0		1	1	4	1 ³	20
	5	1,0	1,0		1	0	5	0	0
	5	1,0	100,0	<i>per os</i>	1	0	5	0	0
	5	1,0	10,0		1	0	5	0	0
	5	1,0	1,0		1	0	5	0	0
Споро-міцеліальна суспензія <i>T. harzianum</i> 128/2	5	1,0	100,0	в/ч	1	1	4	1 ⁴	20
	5	1,0	10,0		1	1	4	1 ⁵	20
	5	1,0	1,0		1	0	5	0	0
	5	1,0	100,0	<i>per os</i>	1	0	5	0	0
	5	1,0	10,0		1	0	5	0	0
	5	1,0	1,0		1	0	5	0	0

*Примітка: 1) в/ч — внутрішньочеревне введення, *per os* — введення через рот; 2) загинула 1 тварина на 4-у добу після ін'єкції; 3) загинула 1 тварина на 9-у добу після ін'єкції; 4) загинула 1 тварина на 10-у добу після ін'єкції; 5) загинула 1 тварина на 19-у добу після ін'єкції.

ності, токсигенності, алергенності, дисбіотичної дії штами асоціації *T. harzianum* 128 можуть вважатися непатогенними.

Висновки. Селекціоновано активну целюлозолітичну асоціацію мікроміцетів *T. harzianum* 128. Компоненти асоціації (*T. harzianum* 128/1 та *T. harzianum* 128/2) непатогенні для теплокровних тварин. Асоціація мікроміцетів перспективна для застосування в технологіях компостування органічної речовини з метою скорочення термінів мінералізації соломи.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Способ микробиологической переработки птичьего помета: пат. № 2437864 РФ, МПК C05F3/00, A01C3/00, C05F11/08. № 2010133029/13; заявл. 05.08.2010; опубл. 27.12.2011, бюл. № 36.

2. Ahmad R., Jilani G., Arshad M., Zahir Z. A., Khalid A. Bio-conversion of organic wastes for their recycling in agriculture: an overview of perspectives and prospects. *Annals of Microbiology*. 2007. Vol. 57, № 4. P. 471–479. <https://doi.org/10.1007/BF03175343>

3. Prabhakaran D., Manivannan S. Effect of inoculating lignocellulolytic fungus on nutrient changes during different phases of composting of poultry droppings amended with bagasse. *International Journal of Zoology and Applied Biosciences*. 2014. Vol. 3, № 9. P. 582–595. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1312781>

4. Gonawala S. S., Jardosh H. Organic Waste in Composting: A brief review. *International Journal of Current Engineering and Technology*. 2018. Vol. 8, № 1. P. 36–38. <https://doi.org/10.14741/ijcet.v8i01.10884>

5. Sánchez Ó. J., Ospina D. A., Montoya S. Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste Manag.* 2017. № 69. P. 136–153. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.08.012>.

6. Bailey B. A., Lumsden R. D. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. *Enzymes, biological control and commercial applications* / E. Harman, C. P. Kubicek. London : Taylor and Francis, 1998. С. 185–204.

7. Билай В. И., Билай Т. И., Мусич Е. Г. Трансформация целлюлозы грибами. К. : Наук. думка, 1982. 296 с.

8. Жданова Н. М., Олішевська С. В., Васи-
левська А. І., Айзенберг В. Л., Курченко І. М.
Скрінінг штамів мікроміцетів, що здатні рости та
руйнувати целюлозовмісний субстрат. *Мікробіо-
логія і біотехнологія*. 2008. № 3. С. 58–64.

9. Bernal-Vicente A., Pascual J. A., Tittarelli F.,
Hernández J. A., Diaz-Vivancos P. *Trichoderma*
harzianum T-78 supplementation of compost
stimulates the antioxidant defence system in melon
plants. *Journal of the Science of Food and*
Agriculture. 2015. Vol. 95, № 11. P. 2208–2214.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.6936>

10. Blaya J., López-Mondéjar R., Lloret E.,
Pascual J. A., Ros M. Changes induced by
Trichoderma harzianum in suppressive compost
controlling *Fusarium* wilt. *Pesticide biochemistry*
and physiology. 2013. Vol. 107, № 1. P. 112–119.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.06.001>

11. Авдеева Л. В., Хархота М. А., Хархо-
та Г. В. Деструкція поживних рослинних зали-
шків штамами *B. subtilis* ІМВ В-7516 і
B. licheniformis МВ В-7515. *Мікробіологічний*
журнал. 2016. Т. 78, № 2. С. 52–60.
<https://doi.org/10.15407/microbiolj78.02.052>

12. Дудка И. А., Вассер С. П., Элланс-
кая И. А., Коваль Э. З. и др. Методы эксперимен-
тальной микологии. Справочник / Под ред.
В. И. Билай. К. : Наук. думка, 1982. 561 с.

13. Александрова А. В., Великанов Л. Л., Си-
дорова И. И. Ключ для определения видов рода
Trichoderma. *Биоразнообразие, систематика,*
экология. 2006. Т. 40, Вып. 6. С. 457–459.

14. Положение о порядке учета, хранения,
обращения, отпуска и пересылки культур бакте-

рий, вирусом, риккетсий, грибов, простейших,
микоплазм, бактериальных токсинов, ядов биоло-
гического происхождения. МЗ СССР. 1980.

15. Медико-біологічні дослідження вироб-
ничих штамів мікроорганізмів і токсико-гігіє-
нічна оцінка мікробних препаратів, визначення
їх безпеки та обґрунтування гігієнічних норма-
тивів і регламентів. Методичні вказівки МОЗ
України. Київ. 2004.

16. Обоснование критериев оценки патоген-
ности мицелиальных грибов-продуцентов и до-
пустимости их применения в промышленности:
метод. рекоменд. Ангарск. 1986.

17. Кожемякін Ю. М., Хромов О. С., Філо-
ненко М. А., Сайфетдінова Г. А. Науково-прак-
тичні рекомендації з утримання лабораторних
тварин та роботи з ними. К. : МОЗУ, Фармкомі-
тет, 2002. 156 с.

18. Денисенко С. В. Біоетичне ставлення до
лабораторних тварин у навчальному процесі. *Ві-
сник ВДНЗУ «Українська медична стоматоло-
гічна академія»*. 2013. Т. 13, № 2. С. 242–245.

19. Хендель Н. В. Регламентация проведения
экспериментів над тваринами: міжнародні та
національні правові стандарти. *Український ча-
сопис міжнародного права*. 2013. Спеціальний
випуск «Міжнародно-правові стандарти повод-
ження з тваринами та їх захисту і практика
України». С. 71–76.

20. Кравченко Н. О., Копилов Є. П., Голо-
вач О. В., Дмитрук О. М. Оцінка патогеності
грунтового гриба *Trichoderma viride* 505. *Сільсь-
когосподарська мікробіологія*. 2014. Вип. 20.
С. 23–28.

Отримано 04.10.2018

UDC 579/631.461

MORPHOLOGICAL AND CULTURAL, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PECULIARITIES OF MICROMYCETES STRAINS INCLUDING IN THE COMPOSITION OF *TRICHODERMA HARZIANUM* 128 ASSOCIATION

S. M. Derkach¹, M. V. Miahka¹, V. V. Volkohon¹, L. T. Nakonechna²,
S. B. Dimova¹, N. O. Kravchenko¹, N. V. Lutsenko¹

¹Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv
e-mail: derkachsergiy888@gmail.com

²Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine, Kyiv

Objective. Screen the active cellulolytic strains of *Trichoderma micromycetes*, investigate their
morphological and cultural, physiological and biochemical properties for further use in the com-
posting of organic substrates as a straw destroyer. **Methods.** Microbiological, biochemical, statisti-
cal. **Results.** 150 isolates of cellulolytic microscopic fungi of the genus *Trichoderma* were obtained

from semi-decomposed straw. Among isolated fungi, the most active influence on the destruction of cellulose is typical for the association of micromycetes *Trichoderma* sp. 128. The components of the association (*Trichoderma* sp. 128/1 and *Trichoderma* sp. 128/2, respectively) differ in their nature of growth in the digest medium, colouring of colonies, and cellulolytic activity. Under simultaneous cultivation of the association components in a medium where the only source of carbon is filter paper or straw, higher effect was observed compared with than their separate cultivation. The selected association provides a degree of straw decomposition of up to 33 % over a period of 21 days, which exceeds the activity of the known cellulolytic strain *Trichoderma harzianum* F-2455. By morphological and cultural, physiological and biochemical properties, the components of the fungal association have been identified as *Trichoderma harzianum* 128/1 and *T. harzianum* 128/2 (association — *Trichoderma harzianum* 128, respectively). Under the study of virulence of microorganisms on the model of white mice, it was established that the association components are not pathogenic for warm-blooded animals, which allows the association to be used in the production.

Conclusion. Active cellulolytic association of micromycetes which includes two strains has been selected. The association is identified as *Trichoderma harzianum* 128. The use of the association of micromycetes can be promising when composting organic matter, in order to accelerate its mineralization.

Key words: decomposition of straw, composting, micromycetes of the genus *Trichoderma*, *Trichoderma harzianum* 128 association.

REFERENCES

1. Pat. 2437864 Russian, MPK (2010. 08) C05 F 3/00, A01 C 3/00, C05 F 11/08. Sposob mykrobiolohicheskoi pererabotki pticheho pometa [Method for microbiological processing of poultry manure]. Dmitriiev, V. Y., Martinova, Y. V., Kochkina, L. Y. LLC "Microbiotech". № 2010133029/13; stated. 05.08.10; bjul. 27.12.2011. 36 p. [in Russian].
2. Ahmad, R., Jilani, G., Arshad, M., Zahir, Z. A., & Khalid, A. (2007). Bio-conversion of organic wastes for their recycling in agriculture: an overview of perspectives and prospects. *Annals of Microbiology*, 57(4), 471–479. <https://doi.org/10.1007/BF03175343>
3. Prabhakaran, D., & Manivannan, S. (2014). Effect of inoculating lignocellulolytic fungus on nutrient changes during different phases of composting of poultry droppings amended with bagasse. *International Journal of Zoology and Applied Biosciences*, 3(9), 582–595. doi.org/10.5281/zenodo.1312781
4. Gonawala, S. S., & Jardosh, H. (2018). Organic Waste in Composting: A brief review. *International Journal of Current Engineering and Technology*, 8(1), 36–38. <https://doi.org/10.14741/ijcet.v8i01.10884>
5. Sánchez, Ó. J., Ospina, D. A., & Montoya, S. (2017). Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste Manag*, 69, 136–153. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.08.012>
6. Bailey, B. A., & Lumsden, R. D. (1998). Direct Effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on Plant Growth and Resistance to Pathogens. In C. P. Kubicek, G. E. Harman and K. L. Ondik (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, Biological Control and Commercial Applications* (pp. 185–204). London: Taylor and Francis.
7. Bylai, V. I., Bylai, T. I., & Musich, E. G. (1982). *Transformatsia tselulozy gribamu* [Cellulose transformation by fungi]. Kiev: Nauk. Dumka [in Russian].
8. Zhdanova N., Olishevskaya S., Vasylevska A., Aizenberg V., Kurchenko I. (2008). Skryning shtamiv mikromitsetiv, scho zdatni rosty ta ruinuvat tselulozovmistnyi substrat [Screening of strains of micromycetes which are capable to grow and destroy cellulosic substrate]. *Microbiology and biotechnology*, 3, 58–64 [in Ukrainian].
9. Bernal-Vicente, A., Pascual, J. A., Tittarelli, F., Hernández, J. A., & Diaz-Vivancos, P. (2015). *Trichoderma harzianum* T-78 supplementation of compost stimulates the antioxidant defence system in melon plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(11), 2208–2214. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6936>
10. Blaya, J., López-Mondéjar, R., Loret, E., Pascual, J. A., & Ros, M. (2013). Changes induced by *Trichoderma harzianum* in suppressive compost controlling *Fusarium* wilt. *Pesticide biochemistry and physiology*, 107(1), 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.06.001>
11. Avdeeva, L. V., Kharkhota, M. A., & Kharkhota, A. V. (2016). The Decomposition of Various Types of Crop Residues by Strains *Bacillus subtilis* IMB B-7516 and *B. licheniformis* IMB B-7515. *Mikroboil. Z.*, 78(2), 52–60 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/microbiolj78.02.052>
12. Bylai, V. I. (Ed.). (1982). *Metody eksperimentalnoy mikologii* [Methods of experimental mycology]. Kiev: Nauk. Dumka [in Russian].
13. Aleksandrova, A., Velikanov, L., & Si-

dorova, I. (2006). Kliuch dlia opredeleniia vidov roda *Trichoderma* [The key to determining the species of the genus *Trichoderma*]. *Biodiversity, taxonomy, ecology*, 6, 457–459 [in Russian].

14. *Polozhenye o poriadke ucheta, khraneniya, obrashcheniya, otpuska i peresyilki kultur bakteriy, virusov, rykketsii, hrybov, prosteishykh, mykoplazm, bakteriyinykh toksynov, yadov biolohicheskoho proiskhozhdeniya*. MZ SSSR [Regulations on the procedure for recording, storing, handling, dispensing and sending cultures of bacteria, viruses, rickettsia, fungi, protozoa, mycoplasmas, bacterial toxins, poisons of biological origin]. (1980). USSR Ministry of Health [in Russian].

15. *Medyko-biolohichni doslidzhennia vyrobnychykh shtamiv mikroorhanizmiv i toksyko-hihiienichna otsinka mikrobnykh preparativ vyznachennia yikh bezpeky ta obgruntuvannia hihiienichnykh normatyviv i rehlamentiv. Metodychni vkazivky MOZ Ukrainy* [Medical-biological research of production strains of microorganisms and toxic hygienic assessment of microbial preparations, determination of their safety and substantiation of hygienic norms and regulations. Methodical instructions of the Ministry of Health of Ukraine]. (2004). Kyiv [in Ukrainian].

16. *Obosnovaniie kriteriiev otsenky patohennosti myselialnykh hrybov-produtsentov i dopustimosy ikh primeneniia v promyshlennosti metod. rekomend* [Substantiation of criteria for evaluation of pathogenicity of mycelial fungi-producers and ad-

missibility of their application in industry: methodical recommendations]. (1986). Angarsk [in Russian].

17. Kozhemiakin, Yu. M., Khromov, O. S., Filonenko, M. A., Saifetdinova, H. A. (2002). *Naukovo-praktychni rekomendatsii z utrymannia laboratornykh tvaryn ta roboty z nymy* [Scientific and practical recommendations for the management of laboratory animals and work with them]. Kyiv. 155 p. [in Ukrainian].

18. Denysenko, S. V. (2013). Bioetychne stavlennia do laboratornykh tvaryn u navchalnomu protsesi [Bioethical attitude towards laboratory animals in the educational process]. *Herald of HSEE of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy"*, 13(2), 242–245 [in Ukrainian].

19. Khendel, N. V. (2013). Rehlametatsia provedennia eksperymentiv nad tvarynamy: mizhnarodni ta natsionalni pravovi standarty [Regulation of experiments on animals: international and national legal standards]. *Ukrainian Journal of International Law*, 71–76 [in Ukrainian].

20. Kravchenko, N. O., Kopylov, Ye. P., Holovach, O. V., & Dmytruk, O. M. (2014). Otsinka patohennosti gruntovoho hryba *Trichoderma viride* 505 [Evaluation of pathogenicity of soil fungus *Trichoderma viride* 505]. *Silskogospodarska mikrobiologia — Agricultural Microbiology*, 20, 23–28 [in Ukrainian].

Received 04.10.2018