

УДК 632.937.14:612.064

ОЦІНКА ПАТОГЕНОСТІ ГРУНТОВОГО ГРИБА *TRICHODERMA VIRIDE* 505

Н. О. Кравченко, Є. П. Копилов, О. В. Головач, О. М. Дмитрук

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14027, Україна; e-mail: nat.probiotik@gmail.com

Перевірку патогенних властивостей ґрунтового гриба-антагоніста *Trichoderma viride* Pers виконано у гострих дослідках на моделі білих мишей. Визначено LD_{50} штаму, проведено патологоанатомічні та бактеріологічні дослідження внутрішніх органів лабораторних тварин.

Згідно отриманих результатів *T. viride* Pers 505 належить до групи авірулентних мікроорганізмів, не здатних до інвазії у внутрішні органи досліджуваних теплокровних тварин і може вважатися непатогенним.

Ключові слова: *Trichoderma viride* Pers, вірулентність, патогенність, інфективність (інвазивність)

Світова практика свідчить про наявність тенденції до збільшення втрат урожаю сільськогосподарських культур у результаті життєдіяльності шкідливих організмів. Запобігти цьому не вдається за використання хімічних засобів захисту рослин та посівів хворобостійких сортів. Тому для багатьох розвинених країн актуальною є необхідність зменшення обсягів застосування пестицидів через негативні явища, що виникають при їх широкому використанні.

Вищезазначене спонукає до пошуку нових методів захисту рослин від хвороб, більш досконалих у порівнянні з традиційними. Альтернативою хімічному методу був і залишається інтегрований захист рослин, важливою складовою якого є біологічний метод, зокрема, застосування мікробних препаратів. Мікробні препарати не забруднюють довкілля, виявляють високу селективну дію, зручні для виробництва. При їх використанні продукція рослинництва не містить пестицидних залишків, зменшується хімічне навантаження на довкілля.

Серед біоагентів мікробних препаратів для захисту рослин від збудників корневих хвороб найбільший інтерес викликають представники широко поширених ґрунтових мікроміцетів роду *Trichoderma* Pers. Гриби роду *Trichoderma* характеризуються антибіотичними й антагоністичними властивостями.

Антагоністична дія грибів роду *Tricho-*

derma обумовлена їх здатністю утворювати антибіотики (гліотоксин, вірідін, аламецин та інші), гідролітичні ферменти, а також активно конкурувати при освоєнні живильного субстрату та виявляти гіперпаразитичну активність [1–3].

Роботи, присвячені вивченню антагоністичних властивостей грибів даного роду та ефективності їх використання як засобів захисту рослин від збудників хвороб, мають давню історію. Встановлено, що *Trichoderma lignorum* і *T. harzianum* пригнічують розвиток *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. roseum*, *F. solani* та *Bipolaris sorokiniana* як у лабораторних умовах, так і в польових дослідках. Внесення даних антагоністів у ґрунт сприяє значному обмеженню розвитку корневих гнилей пшениці ярої, ячменю ярого, бавовнику, дині [4; 5].

Про антагоністичну активність видів *Trichoderma* щодо фітопатогенного гриба *Pseudocercospora herpotrichoides* свідчать дані, одержані англійськими дослідниками [6]. Автори відзначають, що серед вивчених мікроміцетів-антагоністів, які належать до різних родів, найактивніше пригнічували розвиток патогена представники роду *Trichoderma*. Проведені дослідження являють інтерес, оскільки патоген *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron.) Deighton (до 1973 року відомий як *Cercospora herpotrichoides* Fron.) — збудник церкоспорельозної гнилі

ячменю та інших зернових культур [7], викликає почорніння та відмирання коренів, колеоптіле.

Антагоністичні відносини мають місце між *Trichoderma harzianum* і фітопатогенними грибами роду *Pythium*. Так, дослідями, проведеними в Ізраїлі, переконливо доведено, що біоагент *T. harzianum* різко обмежував розвиток пітєвої гнилі гороху, огірків, помідорів і перцю. Біологічна ефективність застосування даного антагоніста проти зазначеної хвороби становила 76–88 % [8].

Антагоністичну активність види *Trichoderma* виявляють при взаємодії зі *Sclerotium rolfsii* — збудником склероціальної гнилі цукрового буряку, *Gaeumannomyces graminis* — збудником кореневих гнилей ячменю та інших ярових культур. Антагонізм у даному випадку обумовлений гіперпаразитичною активністю і утворенням токсинів-антибіотиків [9].

Заслужують уваги роботи, в яких розкривається механізм дії видів *Trichoderma*. Так, антагоністична дія *Trichoderma spp.* щодо фітопатогенного гриба *Pythium sp.*, які спільно вирощувалися в одній чашці Петрі, пояснюється фактором, що викликав плазмоліз клітин кінчиків гіф *Pythium sp.* ще до стикування з антагоністом [10]. У даному випадку автори мали справу з летючими антибіотичними речовинами, багато досліджень з якими проводила В. Й. Білай [2]. Встановлено також, що *Trichoderma spp.* відзначається хемотропічною реакцією і здатністю розпізнавати фітопатогенні гриби на відстані. Мабуть, при взаємодії клітин хазяїна і паразита важливу роль відіграють лектини. Антагоніст починає продукувати літичні ферменти тільки після розпізнавання та прикріплення до клітинної стінки гриба-хазяїна. Ферменти антагоніста здатні розкласти полімери, які входять до складу клітинної стінки патогенних грибів. Певним свідченням цього може бути наявність активної хітинази та β -глюканази в ґрунті, заселеному грибами роду *Trichoderma* [11].

Пошук активних штамів грибів роду *Trichoderma* — потенційних агентів біопрепаратів, проводять у багатьох наукових установах. Однією з вимог до перспективних штамів є те, що поряд з високою антагоністичною активністю щодо збудників хвороб рослин, вони повинні бути безпечними для

людини і теплокровних тварин.

Метою нашої роботи було дослідження патогенних властивостей ґрунтового гриба *Trichoderma viride* Pers 505, який характеризується високою антагоністичною та антибіотичною активністю і може бути основою біопрепарату для захисту рослин від збудників хвороб.

Матеріали й методи. Гриб *T. viride* Pers 505 вирощували впродовж 7 діб на сусло-агарі з масовою часткою сухих речовин 3,5 %, рН 7,0 за температури 27 °С. Для досліджень використовували споро-міцеліальну суміш гриба. Гомогенізовану суспензію споро-міцеліальної суміші гриба для введення тваринам готували на стерильному ізотонічному розчині натрій хлориду з попереднім дворазовим відмиванням від метаболітів та осадженням клітин шляхом центрифугування впродовж 20 хв. за 2000 об./хв. Для приготування робочих концентрацій клітин гриба в суспензії користувались камерою Горяєва.

Перевірку патогенних властивостей штаму ґрунтового гриба проводили у гострих дослідях на моделі білих мишей. Безпородним статевозрілим білим мишам масою 18–20 г вводили споро-міцеліальну суміш гриба перорально через зонд та внутрішньочеревно шляхом ін'єкцій. Для перорального введення використовували дози $1,0 \cdot 10^6$; $4,0 \cdot 10^7$; $1,0 \cdot 10^8$ клітин на одну мишу, а для внутрішньочеревних ін'єкцій — дози $1,0 \cdot 10^7$ та $1,0 \cdot 10^8$ клітин на мишу [12]. Миші попередньо були адаптовані до умов утримання впродовж 14 діб. Догляд та спостереження за тваринами проводили щоденно 20 діб поспіль після введення досліджуваного матеріалу [12; 13].

По закінченню терміну спостереження за поведінковими реакціями та фізіологічним станом мишей проводили їх вимушений забій, патологоанатомічний розтин, мікроскопічні дослідження мазків-відбитків внутрішніх органів та висіви зразків тканин (печінка, нирки, селезінка) на елективне живильне середовище.

Утримання, годівлю, догляд та усі маніпуляції з лабораторними тваринами здійснювали згідно з Європейською конвенцією «Про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та науковою метою» (Страсбург, 1986 р.) [14] і «Загальних етичних принципів експериментів на твари-

нах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.) [15]. Експерименти проводили з дотриманням принципів гуманності, викладених у директиві Європейської Спільноти [16].

Вірулентність, що є загально визнаною умовною мірою патогенності, досліджуваного штаму гриба встановлювали за рівнем дози життєздатних мікробних клітин, яка викликає загибель 50 % заражених тварин (LD_{50}). Критерієм авірулентності мікроорганізму слугувала відсутність загибелі мишей упродовж 20 діб та характерних для інфекційної патології змін у внутрішніх органах тварин при патологоанатомічному розтині.

Інфективність (інвазивність) штаму визначали шляхом встановлення можливості дисемінації клітин мікроорганізму у тканини внутрішніх органів тварин після одноразового перорального (*per os*) введення суспензій досліджуваного гриба у макроорганізм. Відсутність росту гриба на сусло-агарі після висіву зразків внутрішніх органів вказувала на неінфективність (неінвазивність) досліджуваного мікроорганізму.

Результати та їх обговорення. Штам *T. viride* 505 виділено з ризосфери люпину. Колонії на сусло-агарі швидко ростуть, утворюють білу міцеліальну плівку з темно-зеленою конідіальною зоною. Міцелій складається з безбарвних, гладеньких, сильно гіллястих гіф, 3,6–7,5 мкм в діаметрі. Хламідоспори інтеркалярні, інколи верхівкові, 12–15 мкм в діаметрі. Конідієносці дуже гіллясті в компактних або пухких подушечках, з головною віссю, товщиною 3,5–4,0 мкм. Стеригми утворюють несправжні кільця з 2–3 стеригм. Стеригми мінливі за розміром, 8–12 × 2,5–3,0 мкм, трапляються і довжиною до 18 мкм, прямі, звужені в основі, найбільш широкі вище середини, далі звужуються у довгу шийку. Конідії кулясті і короткояйцевидні, 3,5–4,2 × 3,5–4,0 мкм.

Штам резистентний до антибіотиків (пеніциліну, стрептоміцину), характеризується високою антагоністичною та антибіотичною активністю.

Досліджуваний рід і вид мікроорганізмів не включено до переліку небезпечних біологічних об'єктів, які можуть інфікувати людей і тварин або бути для них токсичними чи алергічними чинниками [17–19]. Разом з тим, поряд з відомими ферментами грибів роду

Trichoderma, що вже давно і успішно використовуються у промисловості та в сільському господарстві, виявляються нові ще не вивчені продуценти, які, в свою чергу, потребують детального вивчення, особливо з огляду на те, що у деяких випадках *Trichoderma* може становити загрозу для здоров'я людини [20].

Щоб підтвердити відсутність патогенної дії *Trichoderma viride* Pers 505 для теплокровних лабораторних тварин, досліджували один із показників патогенності — вірулентність культури мікроорганізму на моделі білих мишей [12; 13; 21–23].

За період спостереження після введення тваринам споро-міцеліальної суспензії живих клітин гриба перорально та внутрішньочеревно вони добре поїдали корм, мали жвавий вигляд та блискучий хутряний покрив. Вірогідна різниця у масі та температурі тіла дослідних та контрольних тварин, а також в загальному стані організму, поведінці була відсутня. Тварини були активними, фізіологічні функції організму у нормі, клінічних ознак токсикозу не відмічено. Проте на 19-ту добу у групі тварин, яким вводили досліджуваний матеріал внутрішньочеревно у дозі $1,0 \cdot 10^7$ клітин на мишу, була виявлена загибель однієї з них. При проведенні патологоанатомічного розтину тварини встановлено відсутність видимих патологічних змін в усіх внутрішніх органах, крім печінки. Поверхня та паренхіма печінки була блідого кольору з наявністю тонких смугастих крововиливів.

Середня летальна доза як за перорально, так і за внутрішньочеревного введення культури гриба *Trichoderma viride* Pers 505 становить $LD_{50 \text{ per os}} > 1,0 \cdot 10^8$ клітин/мишу, $LD_{50 \text{ в/ч}} > 1,0 \cdot 10^8$ клітин/мишу (табл. 1), що свідчить про авірулентність штаму, оскільки згідно з методичними вказівками, затвердженими наказом МОЗ України № 521 від 26 жовтня 2004 року, вірулентними вважаються штами мікроорганізмів, LD_{50} яких при надходженні через шлунок мишей менше за 10^8 КУО на тварину.

Всі миші дослідних і контрольних груп, які залишилися живими після закінчення терміну спостереження, були піддані евтаназії, проведено їх розтин і дослідження внутрішніх органів (табл. 2). Як засвідчили результати розтину, одноразове пероральне та внутрішньочеревне введення культури гриба *Trichoderma viride* Pers 505 не спричинило

Таблиця 1. Результати дослідження вірулентності *Trichoderma viride* Pers 505, n = 5

Матеріал для введення	Група тварин	Доза		Спосіб введення	Курс введення, діб	Кількість мишей, гол.	
		см ³	млн. клітин			загинуло	вижило
Споро-міцеліальна суспензія	I	1,0	10,0	в/ч	1	1*	4
	II	1,0	100,0	в/ч	1	0	5
	III	1,0	100,0	<i>per os</i>	1	0	5
	IV	1,0	40,0	<i>per os</i>	1	0	5
	V	1,0	1,0	<i>per os</i>	1	0	5
Контроль (ізотонічний розчин)	I	1,0	0	в/ч	1	0	5
	II	1,0	0	<i>per os</i>	1	0	5

Примітки: в/ч — внутрішньочеревне введення; *per os* — введення через рот; * — загинула 1 тварина на 19-ту добу після ін'єкції.

Таблиця 2. Результати розтину лабораторних тварин (I–V дослідних та I–II контрольних груп)

Досліджувані органи	Результати патологоанатомічного дослідження
Місце введення	без видимих ознак запального процесу
Серце	в межах анатомічної норми
Легені	в об'ємі не збільшені, поверхні гладенькі, спайок не відмічено, долі легко відокремлюються одна від одної
Шлунок, петлі тонкого і товстого кишковика	зовні без змін та ознак здуття, на розрізі малюнок слизової незмінений
Печінка	темно-червоного кольору, в об'ємі не збільшена, пружної консистенції, середнього кровонаповнення, поверхня гладенька
Нирки	бобоподібної форми, не збільшені, поверхні гладенькі, на розрізі чітко видно малюнок кіркової і мозкової зон, межа між зонами не зглажена
Селезінка	пружної консистенції, в об'ємі не збільшена, на розрізі пульпа помірно повнокровна, темного кольору.

вираженого негативного впливу на стан внутрішніх органів лабораторних тварин.

При бактеріологічному дослідженні проб внутрішніх органів, відібраних при розтині тварин, у жодному випадку не виявлено ретрокультур гриба (табл. 3). Це є свідченням того, що клітини міцеліального гриба *Trichoderma viride* Pers 505 у досліджуваних концентраціях не проникають всередину клітин внутрішніх органів макроорганізму, не розмножуються в них та не викликають типових для інфекційного процесу патологічних змін. На підставі отриманих даних можна зробити висновок про неінфективність (неінвазивність) штаму *Trichoderma viride* Pers 505.

Отже, як пероральне, так і внутрішньочеревне введення суспензії живих клітин

штаму *Trichoderma viride* Pers 505 не призводить до інвазії бактерій у внутрішні органи тварин. Патологоанатомічні та бактеріологічні дослідження внутрішніх органів дослідних тварин засвідчили, що *Trichoderma viride* Pers 505 неінфективний, не дисемінує і не розмножується в організмі теплокровних. Авірулентність штаму гриба для теплокровних тварин підтверджується даними середніх летальних доз як за перорального, так за внутрішньочеревного введення.

Таким чином, згідно отриманих результатів, *Trichoderma viride* Pers 505 належить до групи авірулентних мікроорганізмів, не здатних до інвазії у внутрішні органи досліджених теплокровних тварин і може вважатися непатогенним.

Таблиця 3. Результати бактеріологічного дослідження *Trichoderma viride* Pers 505, n = 5

Матеріал для введення	Група тварин	Доза		Спосіб введення	Бактеріологічне дослідження щодо наявності росту гриба <i>Trichoderma viride</i> Pers 505			
		см ³	млн. клітин		місце введення	печінка	нирки	селезінка
Споро-міцеліальна суспензія	I	1,0	10,0	в/ч	—	—	—	—
	II	1,0	100,0	в/ч	—	—	—	—
	III	1,0	100,0	<i>per os</i>	—	—	—	—
	IV	1,0	40,0	<i>per os</i>	—	—	—	—
	V	1,0	1,0	<i>per os</i>	—	—	—	—
Контроль (ізотонічний розчин)	I	1,0	0	в/ч	—	—	—	—
	II	1,0	0	<i>per os</i>	—	—	—	—

Примітки: в/ч — внутрішньочеревне введення; *per os* — введення через рот; «—» — відсутність на суцільно-агарі росту, характерного для досліджуваного гриба.

1. Влияние гриба *Trichoderma harzianum* на почвенные микромицеты / Александрова А. В., Великанов Л. Л., Сидорова И. И., Сизова Т. П. // Проблемы экол. и физиол. микроорганизмов : тез. докл. науч. конф. к 110-летию со дня рожд. проф. Е. Е. Успенского (Москва, 21 дек. 1999 г.). — М. : МГУ, 2000. — С. 30.

2. Билай В. И. Микроскопические грибы — продуценты антибиотиков / В. И. Билай. — К. : Изд-во АН УССР, 1961. — 181 с.

3. Chet I. Biological control of fungal pathogens / I. Chet, J. Inbar // Appl. Biochem. and Biotechnol. — 1994. — Vol. 48, № 1. — P. 37–43.

4. Коломникова В. И. Антагонизм *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz к грибам рода *Fusarium* и *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker / В. И. Коломникова, М. М. Трушко, А. Г. Новикова // Научн.-техн. бюл. СО ВАСХНИЛ. — 1984. — № 42. — С. 26–29.

5. Siran A. Biological control of *Fusarium spp.* in cotton, wheat and muskmelon by *Trichoderma harzianum* / A. Siran, I. Chet // Phytopathol. Z. — 1986. — № 1. — P. 39–47.

6. Clarkson J. P. Screening for potential antagonists of *Pseudocercospora herpotrichoides* the causal agent of eyespot disease of cereals. 2. Fungi / J. P. Clarkson, J. A. Lucas // Plant Pathol. — 1993. — Vol. 42, № 4. — P. 552–559.

7. Церкоспорельоз пшениці / М. П. Лісовий, С. В. Лисенко, Л. О. Крючкова, Р. Я. Таранюк // Захист рослин. — 1997. — № 10. — С. 10–11.

8. Sivan A. Biological control effects of a new of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum* / A. Sivan, Y. Elad // Phytopathology. — 1984. — Vol. 74, № 4. — P. 498–501.

9. Simon A. Biological control if take-all of wheat by *Trichoderma koningii* under controlled

environmental conditions / A. Simon // Soil Biol. Biochem. — 1989. — Vol. 21, № 2. — P. 323–326.

10. Lifshitz R. Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma spp.* / R. Lifshitz, M. T. Windham // Phytopathology. — 1986. — Vol. 76, № 7. — P. 720–725.

11. Chet I. Mycoparasitism: recognition, physiology and ecology / I. Chet // J. Cell. Biochem. — 1989. — Vol. 13. — P. 153.

12. Обоснование критериев оценки патогенности мицелиальных грибов-продуцентов и допустимости их применения в промышленности : метод. рекоменд. — Ангарск, 1986.

13. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Кожемякін Ю. М., Хромов О. С., Філоненко М. А., Сайфетдінова Г. А. — К. : МОЗУ, Фармкомітет, 2002. — 156 с.

14. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes [електронний ресурс] // European treaty series. — Strasbourg, 1986. — № 123. — 50 p. — Режим доступу : <http://conventions.coe.int/Treaty/en/Treaties/Word/123.doc>.

15. Резников О. Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах / О. Г. Резников // Ендокринологія. — 2003. — Т. 8, № 1. — С. 142–145.

16. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. — 86/609/EC. — 20.10.2010 // Official journal of the European Union. — L276/33–79.

17. Безпека роботи з мікроорганізмами I–II групи патогенності. Державні санітарні правила МОЗ України, ДСП 9.9.5.035.99.

18. Директива 90/679 Ради Європейської економічної співдружності.

19. Категорії біологічних агентів у відповідності до небезпеки та категорії контамінації. — ВООЗ, Консультативний комітет небезпеки патогенів. — 4-е вид., 1995.

20. *Trichoderma longibrachiatum* infection in a pediatric patient with aplastic anemia / [Munoz FM, Demmler GJ, Travis WR et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1997. — Vol. 35. — P. 499–503.

21. Положение о порядке учета, хранения, обращения, отпуска и пересылки культур бактерий, вирусов, риккетсий, грибов, простейших,

микоплазм, бактериальных токсинов, ядов биологического происхождения. — МЗ СССР, 1980.

22. Медико-біологічні дослідження виробничих штамів мікроорганізмів і токсико-гігієнічна оцінка мікробних препаратів, визначення їх безпеки та обґрунтування гігієнічних нормативів і регламентів : метод. вказівки. — К. : МОЗ України, 2004.

23. Методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды. — М., 1991.

ОЦЕНКА ПАТОГЕННОСТИ ПОЧВЕННОГО ГРИБА *TRICHODERMA VIRIDE* 505

Н. А. Кравченко, Е. П. Копылов,
А. В. Головач, Е. Н. Дмитрук

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, г. Чернигов

Проверку патогенных свойств почвенного гриба-антагониста Trichoderma viride Pers выполнено в острых опытах на модели белых мышей. Установлено LD₅₀ штамма, проведены патологоанатомические, бактериологические исследования внутренних органов лабораторных животных.

Согласно полученных результатов штамм T. viride Pers 505 принадлежит к группе авирулентных микроорганизмов, не способных к инвазии внутренних органов исследованных теплокровных животных и может считаться не патогенным.

Ключевые слова: *Trichoderma viride Pers*, вирулентность, патогенность, инфективность (инвазивность).

ASSESSMENT OF PATHOGENICITY OF SOIL FUNGI *TRICHODERMA VIRIDE* 505

N. O. Kravchenko, E. P. Kopylov,
O. V. Golovach, O. M. Dmytruk

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv

Assessment of pathogenic properties of the soil antagonist fungus Trichoderma viride Pers was performed in vivisection on white mice model. During the experiments the LD₅₀ of strain was established, followed by the study of pathological and bacteriological tests of the internal organs of laboratory animals.

According to the results obtained, Trichoderma viride Pers 505 strain belongs to a group of the avirulent microorganisms, not capable to invade internal organs of studied warm-blooded animals and cannot be considered as pathogenic.

Key words: *Trichoderma viride Pers*, virulence, pathogenicity, infectivity (invasiveness).