

## SUSCEPTIBILITY OF ESCHERICHIA COLI TO GREEN SYNTHESIS SILVER NANOPARTICLES OBTAINING ON VEGETAL EXTRACTS

*L. KHROKALO, PhD, associate professor*

*V. VOROBYOVA, PhD, associate professor*

*G. VASYLIEV, PhD, associate professor*

*N. RYZHENKO, K. GLAGUN, O. KORNIKOVA, O. SALAMAHA,*

*Ye. SIROSH, students*

*National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute"*

*E-mail: lkhrokalo@gmail.com*

**Abstract.** Resistance of *E. coli* to nanodispersed systems, obtained on the basis of vegetal extracts and silver nitrate, has been determined in liquid nutrient medium. Vegetal extracts got by water maceration of berry pomaces with ultrasound treatment. Zeta potential of obtained AgNPs were in a band from -15 to -24 mV and average sizes of particles were 80-92 nm. Antimicrobial action of silver nanosystems was tested in 10-times reiterative; the statistical processing of results involved using S-criterion for rejecting gross errors and calculating the average value of suspension optical density with mean square deviation. Control absence of growth was performed on Endo agar. Silver nanosystems on grape crests and pomace, and currant pomace extracts were stable and active against *E. coli* UKM B-906. The minimal bactericidal concentration is 7,5% for the silver nanosystem on grape extract, and 10% for currants extract. Minimal inhibitory concentration are 3,5% and 4,2% correspondently.

**Keywords:** silver nanoparticles, berry pomace extract, *E. coli*, minimal bactericidal concentration, minimal inhibitory concentration

### **Introduction**

Synthesis of silver nanoparticles (Ag-NPs) has the high interest to the scientific community because of their broad

application in the cosmetic, therapeutic and pharmaceutical industry. Silver in various forms including silver metal, silver nitrate, silver sulfonamide, silver acetate, and silver protein are well known

for their antimicrobial properties [1]. Silver based compounds are demonstrated strong biocide effects on Gram-positive and Gram-negative bacteria, mold fungi, viruses and have been used as in biomedical devices, textile industries, water treatment, and food packaging.

Nowadays the great research attention takes place to nanosized materials and metal nanoparticles. Nanosized silver particles with designed surface and structural properties perform an important material with numerous physical (catalytic, electronic, and optical), biological and pharmaceutical applications. In medicine they currently put the great impact in diagnostics, drug delivery, gene therapy, and tissue engineering [2].

The antimicrobial activity of silver nanoparticles (AgNPs) very strongly depends on size of nanoparticles, which play an important role in the inactivation of the microorganisms. Nanoparticles of size range less than 100 nm have become an area of extensive research due to their antimicrobial properties attributed to their large surface area [3].

Synthesis of AgNPs is generally carried out by various physical and chemical methods [4-7]. Most of them are successful, but have some limitations in implementation due to expensive chemical reagents and hazard to environment. In contrast, «green» nanotechnology integrates the principles of chemistry and engineering for producing eco-friendly, safe nanoparticles don't using toxic chemicals in their synthesis protocol and various waste materials have also been utilized [8]. The use of plant extracts, enzymes, bacteria, fungi, and algae provides an environmentally safe route for the production of nanoparticles. The main focus of nanotechnology is to synthesize monodispersed nanoparticles with predictable shape, size, and polymeric coating for potential biomedical applications [2].

The antimicrobial activity of silver nanoparticles against *E. coli* has been investigated by some researches [5,7,9]. Silver nanoparticles was obtained by reaction between silver nitrate and ascorbic acid in the presence the sodium salt of a high-molecular-weight naphthalene sulfonate formaldehyde condensate as stabilizing agent. Getting precipitate was washed five times with deionized water and the obtained the nanosize silver powder by freeze drying. Transmission electronic microscopy demonstrated the average size of obtained silver nanoparticles which reach to 5-20 nm. Finally, powder was dissolved in water and estimated the bactericidal effect in concentration 1-10 % in solid and liquid Luria-Bertani medium with *E. coli*. Results of experiment demonstrated that 100 % inhibition of bacterial growth in agar medium was in plates with 5 % and more concentration of silver nanoparticles powder. In contrast, in liquid medium all estimated concentration didn't have full bactericide effect, but significant grows delay of *E.coli* culture performed in tubes with 10% concentration of silver nanoparticles. Additional analysis was provided due to scanning and transmission electron microscopy for study the biocidal action. Thus, *E. coli* cells were damaged, showing formation of "pits" in the bacteria cell wall [9].

The aim of present research is *in vitro* estimation of bactericidal effect for first-time received original "green synthesis" system of AgNPs, obtained by reducing  $\text{AgNO}_3$  due to compounds of aqueous vegetal extracts, on *Escherichia coli*.

## **Materials and methods**

### *Material*

Strain *Escherichia coli* UKM B-906 was received from Danylo Zabolotny

Institute of Microbiology and Virology National Academy of Science of Ukraine. Bacteria were cultivated in liquid medium meat-peptone broth (MPB) during 6 hours in thermostat with 37°C. Before conducted bactericidal tests, inoculum suspension was diluted with medium up to optical density 0.5 of McFarland standard scale that corresponded 108 colony-forming units CFU per cm<sup>3</sup>.

#### *Obtaining of AgNPs and characterization techniques*

In first, the vegetal extracts were obtaining due to water maceration of berry pomaces with ultrasound (US) treatment. As a plant material for extraction we used such food wastes as crests and pomace of grape, pomegranate pomace, and currant pomace. Sonication was performed for 1 h with frequency 27 kHz and power 200 W. Obtained extract after cooled down was passed through Whatman filter (# 1) for getting homogeneous aqueous disperse system.

In second step, the dispersions of silver nanoparticles were prepared by chemical reaction using vegetal extract as the natural reducing for argentum nitrate and stabilizing of dispersion system agent. Equal volumes of aqueous plant extract were dropwise added to 0.01 M AgNO<sub>3</sub> water solution. The color of the reaction mixture gradually changed over 30 min and as well indicated the formation of AgNPs.

UV-Vis spectra of colloidal solutions were recorded in the wavelength range of 190-700 nm using the UV-5800 PC spectrophotometer (FRU, China) and quartz cuvettes. Zeta potential of colloidal particles was measured on a Zetasizer Nano-25 analyzer (Malvern Instruments Ltd., Malvern, England).

#### *Bactericidal tests*

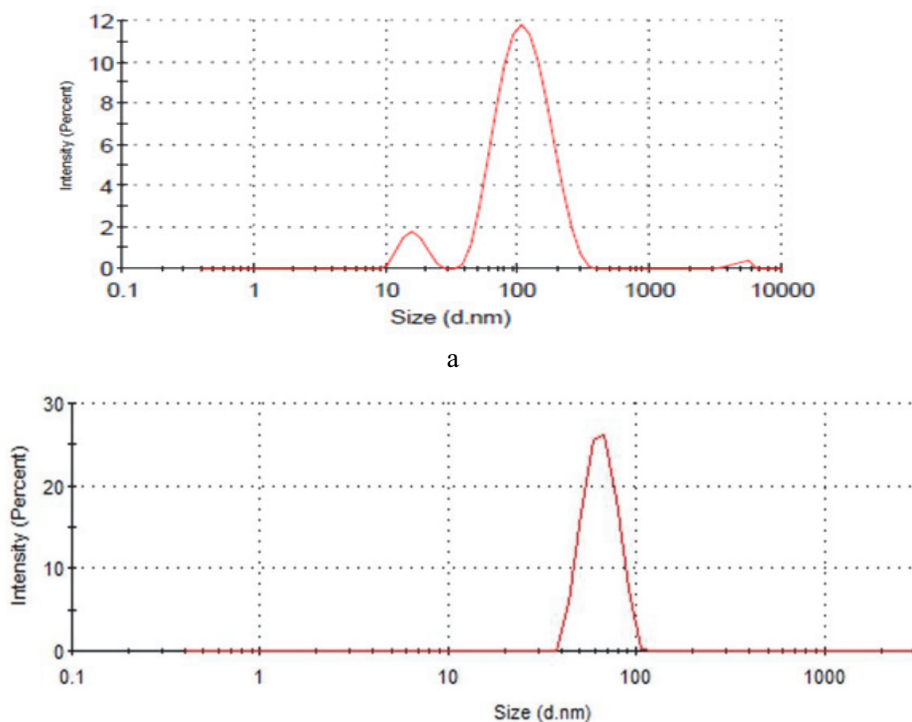
Bacterial susceptibility measured quantitatively in a particular test system and expressed as the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the agents for the strain tested [10]. Active concentrations estimation in liquid medium was performed by the method of evaluation of the action of antibiotics [11], and we used MPB as non-selective nutrient medium. In set of tubes that covered 2 cm<sup>3</sup> of MPB we added 2 cm<sup>3</sup> of AgNPs solution with concentration range and finally added 2 cm<sup>3</sup> of *E. coli* inoculum. In control tube we put 2 cm<sup>3</sup> of MPB, 2 cm<sup>3</sup> of aseptic distilled water, and 2 cm<sup>3</sup> of inoculum. Experiment carried out in 10-times reiterative for ensure of result reproducibility. All tubes incubated in thermostat with 37°C in 24 hours.

After incubation period we conducted photometrically monitoring turbidity (colorimetric changes) in the broth in which the test organism is growing. The results was evaluated as difference in optical density of the suspensions by photoelectric colorimeter with 5 mm quartz cuvette at  $\lambda = 540$  nm (for most samples) or 670 nm and 750 nm (for dark opaque samples with high concentration of silver nanoparticles solution). As additional control was carried out taking samples from each tube and put on solid selective medium Endo agar in Petri dishes, which were incubated for at 37°C in two days and, finally, analyzed visually for present or absent bacteria growth.

## **Results and discussion**

#### *Chemical characteristics of obtained disperse system*

Formation of silver nanoparticles was monitored by UV-vis spectrum and



**Fig. 1. The silver nanoparticle size distribution by intensity obtained by the various extracts: a - grape pomace, b – currant**

concluded that reaction was completed within 30 min of exposure. Dynamic light scattering (DLS) used for measure the hydrodynamic size of nanoparticles in suspensions. The chart with sizes distribution frequencies of two hours after synthesized AgNPs is showed on Fig.1.

Zeta potential measurements were conducted to evaluate the stability of the disperse system (table 1). In general, a suspension that exhibits a zeta potential more than  $-20$  mV (less than the absolute value of a number 20) is considered

unstable and will result in particles settling out of solution in the absence of other factors.

#### *Antibacterial properties*

MBC was described as the lowest concentration of AgNPs solution in tube in which there wasn't significant changes of turbidity and found any colony in Endo agar. MIC is estimating as concentration in tube in which turbidity (optical density) was doubly decreased.

### **1. Characteristics of silver nanoparticles synthesized using the various extract**

NP	Zeta potential, $\Delta$ mV	Average NP size, nm
AgNPs on grape extract	-15.31	92
AgNPs on currant extract	-24.23	80

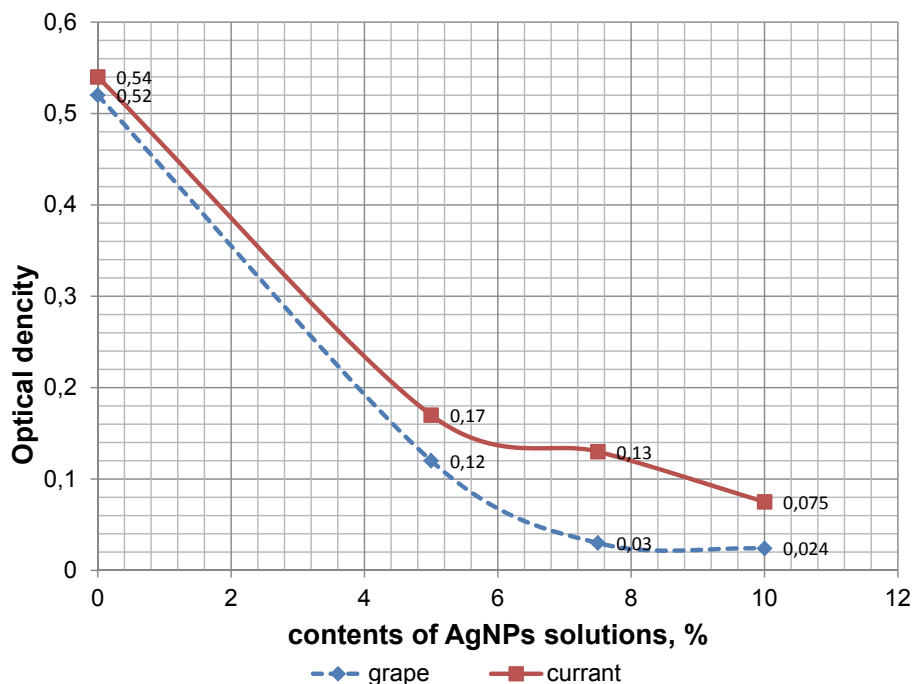
**2. Optical density of test tubes content set and growth on Endo agar**

AgNPs on grape extract						
	Control	1%	5%	7,5%	10%	15%
Opt.den	0,52± 0,015	0,43± 0,008	0,12± 0,016	0,03± 0,005	0,024± 0,005	0,025± 0,005
Growth on Endo agar	+	+	+	-	-	-
AgNPs on currant extract						
	Control		5%	7,5%	10%	
Opt.den	0,54± 0,02		0,17± 0,015	0,13± 0,005	0,075± 0,004	
Growth on Endo agar	+		+	+	-	

Experimental results of susceptibility of *E. coli* strain cultivated in liquid nutrient medium with addition concentration range of silver nanoparticles solutions, obtained on a base of different vegetal extract are present in table 2. Statistical processing

of experiment results were as rejection of gross errors using the S-criteria and the calculation of the average value of optical density with mean square deviation.

Low values of optical density at least less than 0,075 as well absent of



**Fig. 2. Chart for graphical extrapolation and estimation of MIC of AgNPs obtained on a base vegetal extracts**

bacteria growth on Endo agar allow us to determinate the minimal bactericidal concentration of each sample of AgNPs solutions.

For estimation and compare the minimal inhibitory concentrations of different AgNPs solutions have been used graphical method as determination of agent concentration that are corresponded to half value of optical density in relation of control tube in each sample (fig 2.)

Therefore, for Ag NPs obtaining on a base of grape extract MBC is 7,5 % and MIC is 3,5%; for currant extract MBC is 10 % and MIC is 4,2 %.

### Conclusion

As experiment demonstrated, the most effective system against *E. coli* UKM B-906 was a disperse system of silver nanoparticles obtained from AgNO<sub>3</sub> and grape crests and pomace extract which contained the optimal ratio of compounds as excellent reducing of argentum salt and stabilizing of nanodisperse system agents. Probably, the active molecules present in the extracts such as polyphenols and triterpenes promote the reduction of metal ions.

---

### References

1. Gerald, McD., Russell, A. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiological Reviews*, 12 (1), 147-179. doi: 10.1128/CMR.12.1.147
2. Hamouda, I. (2012). Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. *Journal of Biomedical Research*, 26 (3), 143-151.
3. Busi, S., Rajkumari, J. (2019). Microbially synthesized nanoparticles as next generation antimicrobials: scope and applications. *Nanoparticles in Pharmacotherapy*, 485-524. doi:10.1016/b978-0-12-816504-1.00008-9
4. Hussain, J., Kumar, S., Hashmi, A., Khan, Z. (2011). Silver nanoparticles: preparation, characterization, and kinetics. *Advanced Materials Letters*, 2, 189-193.
5. Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z., Chen, G. (2015). Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today*, 20 (5), 595-601.
6. Akhtar, M-S., Panwar J., Yun Y-S. (2013). Biogenic Synthesis of Metallic Nanoparticles by Plant Extracts. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1 (6), 591-602.
7. Gandhi, H., & Khan, S. (2016). Biological Synthesis of Silver Nanoparticles and Its Antibacterial Activity. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 7, 366-268.
8. Skiba, M., Vorobyova, V. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using grape pomace extract prepared by plasma-chemical assisted extraction method. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 674 (1), 142-151.
9. Sondi, I., Salopek-Sondi B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E.coli as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275 (1), 177-182.
10. Piddock, L. (1990). Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. 68, 307-318. doi: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb02880.x
11. Opređenje čuvstvitelnosti mikroorganizmov k antibakterialnym preparatam: Metodicheskie ukazaniia. (2004) [Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs: guidelines.]. Federalnyy centr gosspidnadzora Minzdrava Rossii, Moskow, 1-9.

**Хрокало Л., Воробйова В., Васильєв Г., Риженко Н., Гладун К., Корнякова О., Саламаха О., Сірош Є. (2020). ЧУТЛИВІСТЬ *ESCHERICHIA COLI* ДО НАНОЧАСТОК СРІБЛА, ОДЕРЖАНИХ ШЛЯХОМ ЗЕЛЕНОГО СИНТЕЗУ ЗА ДОПОМОГОЮ РОСЛИННИХ ЕКСТРАКТІВ. *BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION*, 11(1): 5-11.**  
<http://journals.nubip.edu.ua/>  
<https://doi.org/10.31548/biologiya2020.01.005..>

**Анотація.** Була визначена активність нанодисперсних систем, одержаних на основі рослинних екстрактів та нітрату срібла щодо *E. coli* в рідкому середовищі. Рослинні екстракти були отримані з ягідних вичавок методом водної мацерації з обробкою ультразвуком. Дзета-потенціал утворених наночастинок срібла був в межах від -15 до -24 мВ, а самі наночастки мали розмір 80-92 нм. Дослід з випробовування антимікробних властивостей наносистем срібла закладали в десятикратній повторності, статистична обробка результатів передбачала використання S-критерію для відкидання грубих похибок та розрахунок середнього значення оптичної густини суспензії з урахуванням середнього квадратичного відхилення. Контрольні висіви проводили на Ендо агар. Наносистеми срібла, одержані на основі екстракту гребенів і вичавок винограду та вичавок смородини виявились стабільними та активними відносно *E. coli* UKM В-906. Мінімальна бактерицидна концентрація становила 7,5 % для наносистем срібла з екстракту винограду та 10 % – для екстракту смородини. Мінімальні інгібуючі концентрації становили відповідно 3,5 % та 4,2 %.

**Ключові слова:** *silver nanoparticles, berry pomace extract, E. coli, minimal bactericidal concentration, minimal inhibitory concentration*

---

## КОРЕЛЯЦІЙНІСТЬ ДЕНДРОМЕТРИЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ТА ІНДЕКСІВ РІЗНОМАНІТНОСТІ ДЕРЕВОСТАНІВ САДОВО-ПАРКОВИХ КУЛЬТУРФІТОЦЕНОЗІВ КРИВОРІЖЖЯ

---

**В. М. САВОСЬКО**, кандидат біологічних наук,  
доцент кафедри ботаніки та екології  
E-mail: [savosko1970@gmail.com](mailto:savosko1970@gmail.com)  
ORCID: 0000-0002-6943-1111

**Н. В. ТОВСТОЛЯК**, здобувач кафедри ботаніки та екології  
Криворізький державний педагогічний університет  
E-mail: [t8920@meta.ua](mailto:t8920@meta.ua)  
ORCID: 0000-0001-9736-7404

**Ю. В. ЛИХОЛАТ**, доктор біологічних наук, професор,  
завідувач кафедри фізіології та інтродукції рослин  
Дніпровський національний університет ім. Олеса Гончара  
E-mail: [lykholat2006@ukr.net](mailto:lykholat2006@ukr.net)  
ORCID: 0000-0003-3354-8251

**І. П. ГРИГОРЮК**, доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України, професор кафедри фізіології, біохімії  
рослин та біоенергетики  
Національний університет біоресурсів і природокористування України  
E-mail: [grigoryik@ukr.net](mailto:grigoryik@ukr.net)  
ORCID: 0000-0002-1706-9077

**Анотація.** Проаналізовано кореляційні залежності дендрометричних показників та індексів різноманітності масивних деревостанів садово-паркових культурфітоценозів Криворіжжя для фітооптимізації навколишнього природного середовища. Польові й камеральні дослідження проведено за загальноприйнятими методиками на 10 об'єктах озеленення і 22 тимчасових моніторингових ділянках, де були з'ясовані: флористичний склад, густина насаджень, висота й діаметр стовбура, сума площ поперечних перерізів, запас стовбурної деревини масивних деревостанів. За класичними формулами розраховані індекси різноманітності деревостанів: Шеннона, Пієлу, Сімпсона та Маргалефа.

Установлено, що в садах і парках Криворіжжя масивні деревостани сформовано з 22 видів, які належать до 13 родів, 12 родин та відділу Покритонасінні. Дендрометричні показники деревостану підтверджують, що види деревних рослин перебувають у стресовому стані внаслідок постійного впливу несприятливих екологічних чинників натурагенного та антропогенного генезису. Доведено, що

між дендрометричними показниками та індексами різноманітності деревостанів садово-паркових культурфітоценозів є статистично значущий зв'язок.

Серед дендрометричних показників, густина насаджень та запас стовбурної деревини виявилися найчутливішими до значень індексів різноманітності деревостанів. Серед індексів різноманіття індекс вирівняності Пієлу виявився найінформативнішим показником.

**Ключові слова:** масивні деревостани, садово-паркові культурфітоценози, флористичний склад, дендрометричні показники, індекси різноманіття, Криворіжжя.

### **Актуальність.**

На початку Третього тисячоліття в промислових регіонах України садово-паркові культурфітоценози залишаються провідним чинником формування середовища життєдіяльності людини. Доведено, що їхні фітооптимізаційні, фітомеліоративні та фіторекреаційні функції реалізуються в повному обсязі завдяки наявності в їхньому складі масивних деревостанів [1-4]. У більшості промислових регіонах України наявні садово-паркові насадження створювали у 60-70-х рр. ХХ ст. з використанням тогочасних досягнень агротехніки та наукової думки. Тому, для сучасних міських садів та парків притаманні певні особливості їхньої структурно-функціональної організації. Проте, сьогодення несе нові виклики, у тому числі і для екологічної науки. Зокрема, у промислових містах степової зони України, види деревних рослин зазнають негативного впливу посушливості клімату, забруднення довкілля та наслідків глобального потепління [5-7]. У результаті цього вони пригнічуються та передчасно зменшують свої екологічні послуги та фітофункції [8-10].

У зв'язку з цим, досі залишається актуальним обґрунтування оптимальної моделі деревних насаджень. Вона

повинна враховувати їхню відповідність екологічним умовам розташування з оптимальною внутрішньою організацією. За таких обставин деревні насадження будуть спроможні максимально використовувати екологічні ресурси як території їхнього розташування, так і створеного ними ценотичного середовища. З часом вони трансформуються в стійкі й фітомеліоративно високоефективні фітоценози. Важливим аспектом у розробці такої моделі є з'ясування залежностей між дендрометричними показниками сучасного стану деревостанів та характеристиками їхньої видової організації (індексами біорізноманіття).

Звідси витікає нагальна потреба з'ясування кореляційності між цими показниками деревостанів садово-паркових культурфітоценозів Криворіжжя (СПКФЦК).

**Метою дослідження** було з позицій екосистемного підходу проаналізувати кореляційні залежності між дендрометричними показниками та індексами різноманітності деревостанів садово-паркових культурфітоценозів Криворіжжя.

### **Матеріал і методи досліджень.**

Нами протягом 2015–2019 рр. комплексно досліджено масивні деревостани (СПКФЦК), які використовують

населення регіону. Під час польових вишукувань маршрутно-рекогносцировочним методом обстежено сади та парки регіону. У 10 об'єктах озеленення закладено 22 тимчасові моніторингові ділянки, у межах яких для кожного екземпляра, за загальноприйнятими методиками [11-13], встановлювали попередню видову приналежність, вимірювали висоту та діаметр стовбура (на відстані 1,3 м від землі).

У камеральних умовах за визначником [11] уточнювали видову назву деревних рослин. Номенклатуру та систематичну упорядкованість таксонів надано згідно з Міжнародним індексом наукових назв рослин – IPNI, <http://www.ipni.org/> [14]. За загальноприйнятими методиками [12, 13] розраховували дендрометричні показники деревостану, зокрема густоту насаджень ( $N_a$ , шт/га), діаметр стовбура ( $D_a$ , см), висоту дерев ( $H_a$ , м), запас стовбурної деревини ( $V_a$ , м<sup>3</sup>/га) та суму площ поперечних перерізів ( $G_a$ , м<sup>2</sup>/га). Установлювали вік насаджень (за архівними матеріалами) та розраховували відносні дендрометричні показники, як діаметр стовбура ( $D_r$ , см\*рік<sup>-1</sup>), висоту дерева ( $H_r$ , м\*рік<sup>-1</sup>), запас стовбурної деревини ( $V_r$ , м<sup>3</sup>/га\*рік<sup>-1</sup>) та суму площ поперечних перерізів ( $G_r$ , м<sup>2</sup>/га\*рік<sup>-1</sup>).

Різноманітність деревостанів СПКФЦК оцінювали за допомогою індексів: різноманітності Шеннона і Сімпсона, вирівняності Пієлу та багатства Маргалєфа, які розраховували за класичними методиками [15-18] з використанням формул 1, 2, 3 та 4.

$$H' = - \sum_{i=1}^S \left( \frac{ni}{N} \right) * \ln \left( \frac{ni}{N} \right) \quad (1)$$

де:  $H'$  – індекс різноманітності Шеннона,  $S$  – кількість видів у межах тимчасової моніторингової ділянки,  $ni$  – оцінка «значущості»  $i$ -го виду,  $N$  – за-

гальна оцінка «значущості» видів у межах тимчасової моніторингової ділянки,  $\ln$  – натуральний логарифм.

$$Eq = \frac{H'}{\ln(S)} \quad (2)$$

де:  $Eq$  – індекс вирівняності Пієлу,  $H'$  – індекс різноманітності Шеннона,  $S$  – кількість видів у межах тимчасової моніторингової ділянки,  $\ln$  – натуральний логарифм.

$$E = \sum_{i=1}^S \left( \frac{ni}{N} \right)^2 \quad (3)$$

де:  $E$  – індекс різноманітності Сімпсона,  $S$  – кількість видів у межах тимчасової моніторингової ділянки,  $ni$  – оцінка «значущості»  $i$ -го виду,  $N$  – загальна оцінка «значущості» видів у межах тимчасової моніторингової ділянки.

$$Ma = \frac{(S-1)}{\ln(N)} \quad (4)$$

де:  $Ma$  – індекс багатства Маргалєфа,  $S$  – кількість видів у межах тимчасової моніторингової ділянки,  $N$  – загальна оцінка «значущості» видів у межах тимчасової моніторингової ділянки,  $\ln$  – натуральний логарифм.

За розрахунків індексів різноманітності в межах кожної тимчасової моніторингової ділянки використовували такі дендрометричні показники кожного виду: густоту насаджень, запас стовбурної деревини та суму площ поперечних перерізів.

Отримані результати розрахунків опрацьовували математично з застосуванням методів і алгоритмів варіаційної та кореляційної статистики [19].

### **Результати дослідження та їхнє обговорення.**

Загальна характеристика СПКФЦК. Формування садів і парків Криворіж-

жя, екологічні умови територій їхнього розташування, флористичний склад і ботаніко-географічну характеристику та еколого-ботанічну обумовленість поширеності видів деревних рослин, а також основні показники деревостанів СПКФК розглянуто у попередніх наших публікаціях [20-24]. У подальшому наводимо загальну характеристику СПКФЦК в обсязі, який необхідний для розуміння загальної логіки статті.

У Криворізькому гірничо-металургійному регіоні більшість садів і парків створено в 30-х та 50-60-х роках ХХ ст. одночасно з його бурхливою індустріалізацією. Проте в 70-80-х роках ХХ ст. значна кількість запланованих об'єктів озеленення залишилися лише в проектах [21]. Наприкінці ХХ ст. та початку ХХІ ст. негативні явища в садово-парковому будівництві лише посилюються. Водночас, значна кількість садів і парків потрапили в депресивні мікрорайони Криворіжжя, до зони шахтних обвалень або залишилися поза увагою колишніх власників та міської влади.

Ріст і розвиток деревних рослин відбувається за інтегрального впливу екологічних чинників, котрі, у свою чергу, поділяють на натуралістичні та антропогенні [2, 25]. Серед природних чинників критичними, і тому найзначущими, є родючість (трофічність) та, особливо на Криворіжжі, вологість (гідрологічність) ґрунтів. Серед антропогенних чинників суттєве забруднення атмосферного повітря значно погіршує екологічні умови зростання видів деревних рослин.

Загалом, поєднуючи можливі ефекти взаємодії природних ґрунтово-гідрологічних показників й антропогенних чинників забруднення атмосферного повітря [4, 6] ми виділили сприятливі (СУ), відносно сприят-

ливі (ВСУ), відносно несприятливі (ВНУ) зони екологічних умов росту й розвитку рослин у деревостанах садів і парків Криворіжжя.

За результатами проведеної оцінки [20-22] і даними інших авторів [26-28] у парках, садах і скверах Криворіжжя зростає понад 150 видів деревних і чагарникових рослин. Проте масивні деревостани СПКФЦК сформовані лише з 23 видів, що належать до 13 родів, 12 родин і відділу Покритонасінні. Нами в межах однієї моніторингової ділянки виявлено від 1 до 8 видів дерев (в середньому від 4 до 5). Водночас, на 7 ділянках (31,82 % від їхньої загальної кількості) є лише 1-2 види дерев, 3 (13,64 %) – 2-4, 9 (40,91 %) – 4-6 та 3 (13,64 %) – 6-8. У межах моніторингових ділянок масивних деревостанів СПКФЦК алахтонними (не місцевими) є 14 видів дерев (або 60,87 % від їхньої загальної кількості). Серед видів у масивних деревостанах СПКФЦК максимальну загрозу для фіторізноманіття регіону становлять робінія звичайна (*Robinia pseudoacacia* L.) та клен ясенелистий (*Acer negundo* L.), які, згідно А.В. Зав'ялової [29], віднесені до чорного списку (Black List) як найнебезпечніші інвазійні рослини. За даними Г.Н. Шоль [30], ці види становлять суттєву загрозу для збереження біорізноманіття видів деревних рослин на Криворіжжі.

*Дендрометричні показники деревостану СПКФЦК.* За результатами наших досліджень, масивні деревостани СПКФЦК відзначаються типовими абсолютними дендрометричними показниками [24]. Так, густина насаджень становить 500-700 шт/га, висота – 14-18 м, діаметр – 25-32 см, запас стовбурної деревини – 200-450 м<sup>3</sup>/га й сума площ поперечних перерізів – 30-50 м<sup>2</sup>/га (рис. 1).

Середні значення дендрометричних показників масивних деревостанів СПКФЦК цілком узгоджуються, з показниками лісових фітоценозів Криворіжжя [4, 6] та з даними інших авторів, які отримано в промислових регіонах степової зони України [31-33].

На нашу думку, для об'єктивного аналізу сучасного стану масивних деревостанів СПКФЦК доцільно застосування відносних значень дендрометричних показників. Вони, зазвичай, відображають приріст ( $\text{м}^3\cdot\text{га}^{-1}\cdot\text{рік}^{-1}$ ,  $\text{см}^2\cdot\text{га}^{-1}\cdot\text{рік}^{-1}$ ), зміни запасу та за-

гальної продуктивності ( $\text{м}^2\cdot\text{га}^{-1}\cdot\text{рік}^{-1}$ ,  $\text{м}^3\cdot\text{га}^{-1}\cdot\text{рік}^{-1}$ ) деревостанів у певних екологічних умовах (рис. 2).

Установлено, що в зоні сприятливих екологічних умов відносні дендрометричні показники масивних деревостанів СПКФЦК мають такі середні значення: висоту дерев –  $0,35\text{-}0,40\text{ м}\cdot\text{рік}^{-1}$ , діаметр –  $0,65\text{-}0,80\text{ см}\cdot\text{рік}^{-1}$ , запас стовбурної деревини –  $7,50\text{-}10,50\text{ м}^3/\text{га}\cdot\text{рік}^{-1}$ , суму площ поперечних перерізів –  $0,8\text{-}1,0\text{ м}^2/\text{га}\cdot\text{рік}^{-1}$  (рис. 2).

Установлені нами значення відносних дендрометричних показни-

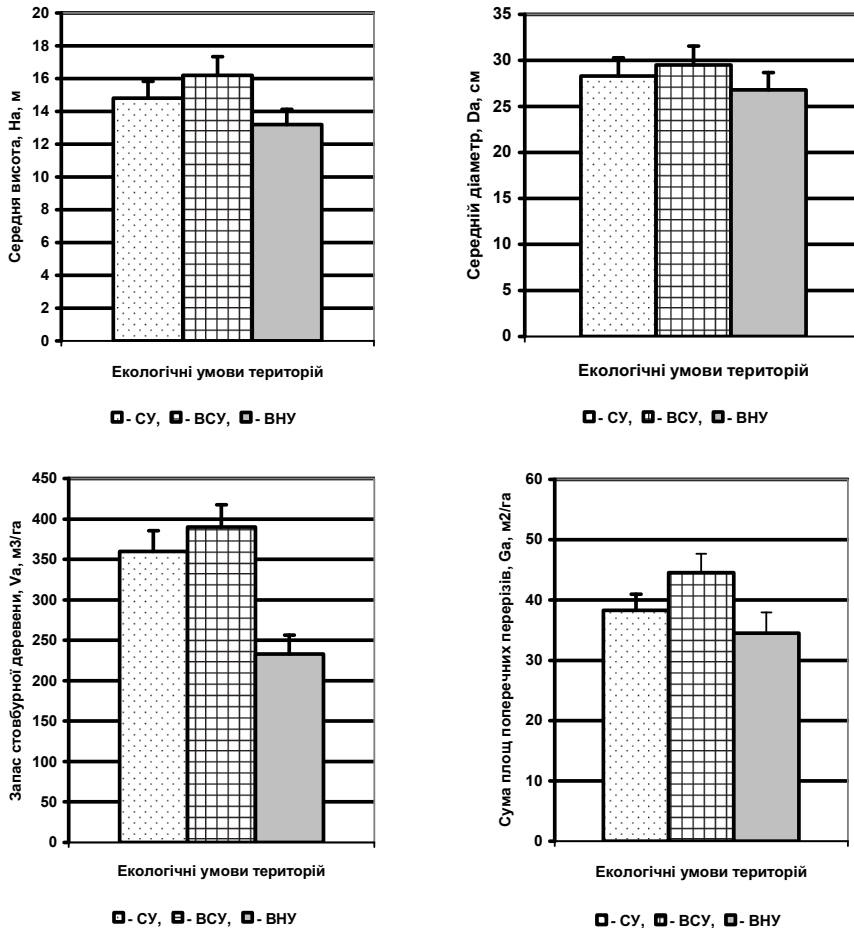


Рис. 1. Абсолютні дендрометричні показники деревостанів СПКФЦК

ків деревостанів СПКФЦК деревних рослин провідних родин збігаються з нормативними даними росту та розвитку [33, 34]. Проте названі показники на 15-25 % вищі, ніж лісових культурфітоценозів у Криворізькому регіоні [4, 6].

Зміна екологічних умов території розташування СПКФЦК істотно, проте різновекторно, вплинула на відносні дендрометричні показники масивних деревостанів. Так, у зоні відносно сприятливих екологічних умов ми встановили збільшення ( $P < 0,05$ ), порівняно з екологічною зоною спри-

ятливих умов, їхнього: середнього діаметра на 7,04 %, запасу стовбурної деревини – 8,87, середньої висоти – 13,51 та суми площ поперечних перерізів – 16,67 %. Одночасно визначено, що в зоні відносно несприятливих екологічних умов, навпаки, простежується достовірне зменшення ( $P < 0,05$ ) діаметра і висоти відповідно на 9,86 та 10,81 %, . У цих умовах наіntenсивніше зниження відносних дендрометричних показників було притаманне для суми площ поперечних перерізів – на 14,58 та запасу стовбурної деревини – на 24,28 %.

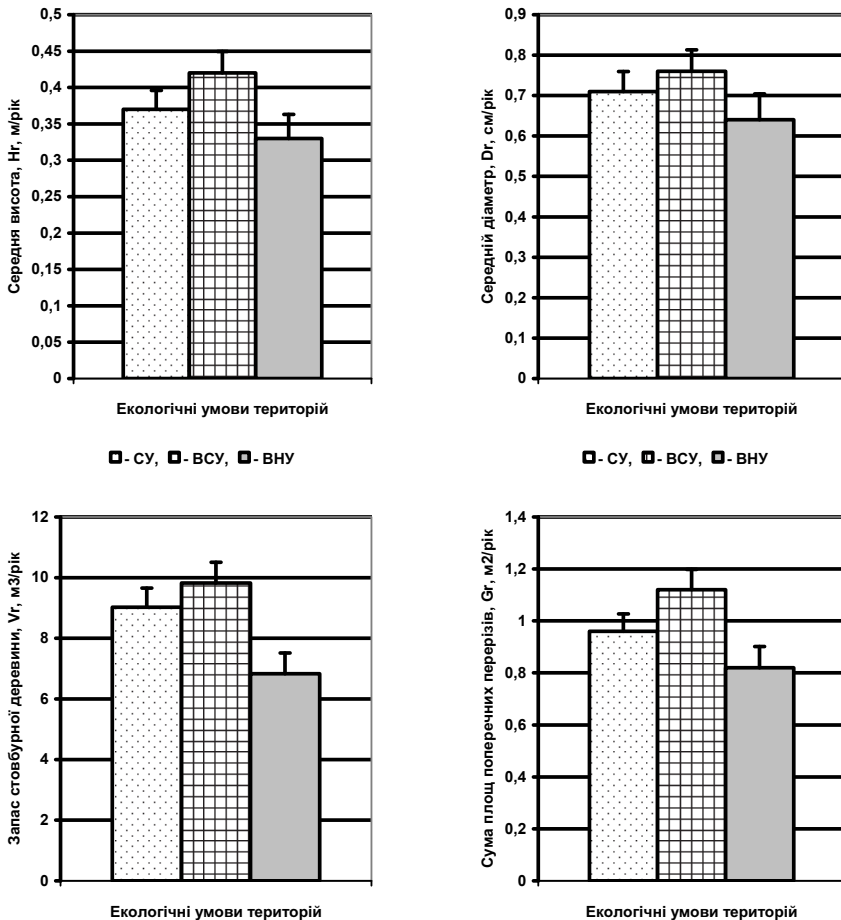


Рис. 2. Відносні дендрометричні показники деревостанів СПКФЦК

Показники різноманітності деревостану СПКФЦК. Відповідно до сучасної наукової думки, під  $\alpha$ -різноманіттям окремих фітоценозів розуміють їхнє видове багатство, визначене за допомогою спеціальних індексів, розрахунок яких здійснюють на основі значень кількості та відносної рясності видів [35, 36, 37]. Найчастіше для оцінки різноманіття рекомендують використовувати інформаційні індекси: різноманітності Шеннона, вирівняності Пієлу, домінування Сімпсона, а також відносного видового багатства Маргалефа [38, 39, 40, 41].

Аналіз отриманих результатів показав, що значення індексу різноманітності Шеннона деревостанів СПКФЦК коливається в діапазоні від 0,75 до 1,61 за середнього значення 0,99 (табл. 1).

Показано, що індекс різноманіття Шеннона показує складність структури природного або штучного угруповання, який ґрунтується на кількісній представленості видів рослин. Він, зазвичай, коливається в межах від 0,5 до 4,5 [42-44]. Отримані нами результати свідчать щодо спрощеної видової структури масивних деревостанів СПКФЦК. Отримані у відносно сприятливої і відносно несприятливої екологічних зонах чисельні значення цього індексу були на 22-49 % нижчі за показники зі сприятливої зони росту та розвитку рослин деревостанів (табл. 1).

Числові значення індексу Шеннона, які розраховано з використанням даних густоти насаджень деревостану в зонах сприятливих і відносно сприятливих екологічних умов виявилися на 21-32 % більшими, порівняно з показниками запасу стовбурної деревини та суми площ поперечних перерізів.

Фактично індекс вирівняності Пієлу є «похідною» індексу різноманітності Шеннона (див. формулу 2 розрахунку цього показника). Зазвичай, цей індекс коливається від 0 до 1, водночас, вищі його числові значення свідчать щодо про вирівняності розподілу видів та їхньої відносної рясності [36, 45, 46]. За нашими розрахунками, значення індексу вирівняності Пієлу деревостанів СПКФЦК змінюється від 0,53 до 0,86 за середнього значення 0,63 (табл. 1). Отримані результати підтверджують вирівняність деревостанів, що значно відрізняється від показників природних лісових фітоценозів [36, 38]. У результаті прослідковуються певні тенденції щодо змін числових значень індексу вирівняності Пієлу залежно від умов територій деревостанів та способів розрахунку.

Закономірності домінування видів у фітоценозах наочно відображає індекс різноманітності Сімпсона. У сучасному розумінні він маніфестує імовірність приналежності будь-яких двох особин у виборці до двох різних видів. Водночас його мінімальне значення зареєстровано в умовах найбільшої вирівняності фітоценозу (всі види мають однакову рясність), а максимальне – домінування одного виду [42, 47]. Нашими розрахунками встановлено, що значення індексу різноманітності Сімпсона деревостанів СПКФЦК становлять 0,24-0,60 за середнього значення 0,50 (табл. 1). Простежуються невисокі рівні різноманітності деревостанів СПКФЦК. Зокрема, проглядається чітка тенденція щодо збільшення числових значень наявного індексу залежно від екологічних умов територій розташування деревостанів. Так, на теренах відносно сприятливих та відносно несприятливих умов наявний показник

в 1,2-2,4 рази перевищував значення, які отримано в зоні сприятливих екологічних умов. У зонах сприятливих і відносно сприятливих екологічних умов на основі показників густоти насаджень деревостану розраховано числові значення індексу Сімпсона, що були на 15-85 % нижчими за показники запасу стовбурної деревини та суми площ поперечних перерізів (табл. 1).

За сучасними науковими поглядами, індекс Маргалефа маніфестує щільність видів (видове багатство) на певній території. Тому, чим вище його числові значення на окремій ділянці тим більшим видовим багатством досліджена ділянка може бути охарактеризована [35, 38, 48, 49]. Згідно

з нашими розрахунками, показники індексу видового багатства Маргалефа деревостанів СПКФЦК змінюються від 0,87 до 36,97 за середнього значення 7,55 (табл. 1). За способами розрахунків числові значення цього показника в зоні сприятливих умов значно більші, ніж в інших екологічних зонах.

Загалом, масивні деревостани садів і парків Криворіжжя мають спрощену видову структуру, що підтверджено всіма розрахованими індексами біорізноманіття.

*Кореляційність дендрометричних показників та індексів різноманітності.* Кореляційні розрахунки підтвердили, що між абсолютними дендрометричними показниками та

### 1. Індеси різноманітності деревостанів СПКФЦК

Спосіб розрахунку, за	Зони екологічних умов росту та розвитку рослин деревостанів								
	Сприятливі			Відносно сприятливі			Відносно несприятливі		
	М	m	V, %	М	m	V, %	М	m	V, %
Індекс різноманітності Шеннона									
N	1,61	0,14	17,53	0,97	0,20	67,77	0,81	0,25	81,05
V	1,08	0,30	55,19	0,75	0,20	88,01	0,84	0,25	77,84
G	1,25	0,27	43,09	0,78	0,21	86,95	0,85	0,26	79,98
Індекс вирівняності Пієлу									
N	0,86	0,03	7,96	0,67	0,12	56,91	0,59	0,15	64,94
V	0,56	0,14	51,44	0,53	0,11	70,86	0,63	0,14	59,67
G	0,66	0,12	36,42	0,55	0,12	70,16	0,63	0,15	61,87
Індекс різноманітності Сімпсона									
N	0,24	0,04	31,63	0,51	0,10	62,78	0,58	0,12	54,90
V	0,46	0,15	66,41	0,60	0,10	53,26	0,55	0,12	57,90
G	0,39	0,13	64,52	0,58	0,10	56,82	0,56	0,13	59,83
Індекс багатства Маргалефа									
N	1,99	0,26	25,96	1,06	0,21	68,01	0,87	0,27	81,52
V	2,23	0,32	28,52	1,24	0,28	75,34	1,22	0,35	76,32
G	36,97	13,98	75,64	7,79	84,18	35,81	14,55	1,05	79,21

**Примітки:** статистичні показники: М – середня арифметична, m – абсолютна похибка середньої, V, % – коефіцієнт варіації; способи розрахунку: за N – за густиною насаджень, за V – за запасом стовбурної деревини, за G – за сумою площ поперечних перерізів

індексами різноманітності деревостанів СПКФЦК простежується статистично значущий зв'язок (табл. 2). Показано, що достовірні 69 коефіцієнтів кореляції Пірсона (за можливих 180). У 35 випадках вони підтверджують наявність прямого зв'язку ( $r^2 > 0$ ), тобто, у разі зростання чисельних значень індексів різноманітності деревостанів СПКФЦК відбувалося збільшення значень абсолютних дендрометричних показників. Для 34 інших випадків, навпаки, простежувався зворотній кореляційний зв'язок ( $r^2 < 0$ ). На підставі оцінки сили кореляційного зв'язку між абсолютними дендрометричними показниками та індексами різноманітності деревостанів СПКФЦК нами встановлено певні закономірності. Так, у 51 випадках прослідковувався слабкий зв'язок ( $0,3 < |r^2| < 0,5$ ), 13 – середній ( $0,5 < |r^2| < 0,7$ ) та 5 – сильний ( $0,7 < |r^2| < 0,9$ ). У межах матриці випадків дуже сильного кореляційного зв'язку ( $|r^2| > 0,9$ ) не виявлено.

Серед дендрометричних показників, густина насаджень та запас стовбурної деревини виявилися найчутливішими до значень індексів різноманітності деревостанів СПКФЦК. За вектором зменшення кількості випадків і силою кореляційного зв'язку вони упорядковувалися в такий ряд:  $N_a > V_a > H_a > D_a > G_a$ . Серед індексів різноманітності індекс вирівняності Пієлу виявився найінформативнішим показником. Індеси різноманітності за вектором зменшення кількості випадків і силою кореляційного зв'язку вишукувалися в такий ряд:  $E_q > (M_a > E > H')$ . За результатами кореляційного аналізу, серед способів розрахунку отримані нами за показниками запасів стовбурної деревини індекси різноманітності виявилися найінформа-

тивні. За вектором зменшення кількості випадків і силою кореляційного зв'язку способи розрахунку індексів різноманітності розташовувалися у такий спосіб: за  $V >$  за  $N >$  за  $G$ . Екологічні умови території розташування СПКФЦК, певним чином, вплинули на кореляційність дендрометричних показників та індексів різноманітності деревостанів. У відносно несприятливих екологічних умовах визначено найчисельнішу кількість випадків і найбільшу силу кореляційного зв'язку.

Відносні дендрометричні показники деревостанів більш адекватніше маніфестують їхній сучасний стан. Тому, між ними та індексами різноманітності деревостанів СПКФЦК проглядається статистично значущий зв'язок (табл. 3). За нашими розрахунками, достовірні 49 коефіцієнтів кореляції Пірсона (за можливих 144). У 29 випадках вони доводять наявність прямого ( $r^2 > 0$ ), а у 20 – зворотного кореляційного зв'язку ( $r^2 < 0$ ). На підставі оцінки сили кореляційного зв'язку між відносними дендрометричними показниками й індексами різноманітності деревостанів СПКФЦК у 39 випадках виявлено слабкий зв'язок ( $0,3 < |r^2| < 0,5$ ), 7 – середній ( $0,5 < |r^2| < 0,7$ ) та 3 – сильний ( $0,7 < |r^2| < 0,9$ ). Випадків дуже сильного кореляційного зв'язку ( $|r^2| > 0,9$ ) у межах матриці не проглядалось.

З'ясовано, що серед відносних дендрометричних характеристик, показники запасу стовбурної деревини виявилися найчутливішими до значень індексів різноманітності деревостанів СПКФЦК. За вектором зменшення кількості випадків і силою кореляційного зв'язку вони упорядковувались у такий ряд:  $V_t >$

**2. Кореляційна матриця залежностей значень абсолютних дендрометричних показників та індексів різноманітності деревостанів СПКФЦК**

Індекси різноманітності		Зони екологічних умов територій розташування	Абсолютні дендрометричні показники				
Назва	Спосіб розрахунку, за		Na	Ha	Da	Va	Ga
Індекс різноманітності Шеннона	N	СУ	-0,379	0,087	0,472	-0,245	-0,057
		BCY	-0,275	-0,363	-0,033	0,299	0,144
		BHY	-0,563	0,256	0,186	0,355	0,087
	V	СУ	-0,226	-0,408	-0,023	-0,528	-0,320
		BCY	-0,184	-0,157	0,202	0,236	0,196
		BHY	-0,487	0,361	0,152	0,403	0,079
	G	СУ	-0,289	-0,250	0,152	-0,449	-0,240
		BCY	-0,213	-0,165	0,200	0,243	0,185
		BHY	-0,491	0,348	0,151	0,402	0,079
Індекс вирівняності Пелу	N	СУ	-0,362	0,002	0,397	-0,301	-0,104
		BCY	-0,575	0,048	0,306	-0,009	-0,229
		BHY	-0,774	0,631	0,206	0,403	-0,040
	V	СУ	-0,362	-0,469	-0,094	-0,554	-0,349
		BCY	-0,575	0,153	0,393	-0,017	-0,056
		BHY	-0,774	0,791	0,114	0,441	-0,104
	G	СУ	-0,289	-0,250	0,152	-0,449	-0,240
		BCY	-0,213	-0,165	0,200	0,243	0,185
		BHY	-0,491	0,348	0,151	0,402	0,079
Індекс різноманітності Сімпсона	N	СУ	0,368	-0,033	-0,425	0,281	0,087
		BCY	0,357	0,263	-0,057	-0,223	-0,054
		BHY	0,665	-0,404	-0,192	-0,382	-0,035
	V	СУ	0,243	0,371	-0,020	0,510	0,301
		BCY	0,186	0,132	-0,216	-0,237	-0,192
		BHY	0,634	-0,461	-0,180	-0,397	-0,031
	G	СУ	0,276	0,288	-0,111	0,469	0,259
		BCY	0,226	0,128	-0,222	-0,224	-0,162
		BHY	0,626	-0,454	-0,161	-0,394	-0,018
Індекс багатства Маргалєфа	N	СУ	-0,393	0,177	0,548	-0,182	-0,005
		BCY	-0,225	-0,446	-0,112	0,327	0,187
		BHY	-0,442	0,078	0,227	0,278	0,153
	V	СУ	0,276	0,385	0,704	-0,024	0,119
		BCY	0,226	-0,643	-0,329	0,290	0,231
		BHY	0,626	-0,146	-0,016	-0,054	-0,099
	G	СУ	-0,378	0,673	0,860	0,242	0,308
		BCY	-0,177	0,202	0,319	-0,007	-0,083
		BHY	0,311	-0,270	0,214	0,166	0,364

**Примітки:** зони екологічних умов росту та розвитку деревостанів: СУ – сприятливі BCY – відносно сприятливі, BHY – відносно несприятливі; способи розрахунку: N – за густиною насаджень, V – за запасом стовбурної деревини, G – за сумою площ поперечних перерізів; жирним шрифтом виділені значення статистично значущих коефіцієнтів кореляції ( $P < 0,05$ ).

### 3. Кореляційна матриця залежностей значень відносних дендрометричних показників та індексів різноманітності деревостанів СПКФЦ

Індекси різноманітності		Зони екологічних умов територій розташування	Відносні дендрометричні показники			
Назва	Спосіб розрахунку, за		Hr	Dr	Vr	Gr
Індекс різноманітності Шеннона	N	СУ	0,096	0,476	-0,244	-0,049
		ВСУ	-0,354	-0,036	0,301	0,145
		ВНУ	0,237	0,200	0,355	0,089
	V	СУ	-0,386	-0,020	-0,527	-0,313
		ВСУ	-0,155	0,202	0,236	0,198
		ВНУ	0,339	0,163	0,404	0,080
	G	СУ	-0,231	0,155	-0,448	-0,232
		ВСУ	-0,161	0,200	0,242	0,187
		ВНУ	0,326	0,163	0,403	0,080
Індекс вирівняності Пієлу	N	СУ	0,014	0,401	-0,301	-0,096
		ВСУ	0,046	0,301	-0,010	-0,228
		ВНУ	0,625	0,226	0,404	-0,042
	V	СУ	-0,445	-0,091	-0,553	-0,343
		ВСУ	0,146	0,392	-0,017	-0,054
		ВНУ	0,782	0,130	0,442	-0,108
	G	СУ	-0,231	0,155	-0,448	-0,232
		ВСУ	-0,161	0,200	0,242	0,187
		ВНУ	0,326	0,163	0,403	0,080
Індекс різноманітності Сімпсона	N	СУ	-0,044	-0,429	0,280	0,079
		ВСУ	0,257	-0,054	-0,223	-0,054
		ВНУ	-0,388	-0,209	-0,383	-0,035
	V	СУ	0,349	-0,023	0,510	0,301
		ВСУ	0,131	-0,215	-0,236	-0,194
		ВНУ	-0,443	-0,193	-0,397	-0,030
	G	СУ	0,268	-0,115	0,468	0,252
		ВСУ	0,025	-0,287	0,149	0,128
		ВНУ	-0,436	-0,175	-0,394	-0,018
Індекс багатства Маргалефа	N	СУ	0,183	0,552	-0,181	0,003
		ВСУ	-0,436	-0,115	0,327	0,188
		ВНУ	0,057	0,236	0,279	0,157
	V	СУ	0,384	0,708	-0,023	0,126
		ВСУ	-0,632	-0,329	0,290	0,231
		ВНУ	-0,166	-0,009	-0,054	-0,093
	G	СУ	0,661	0,863	0,242	0,313
		ВСУ	0,203	0,320	-0,008	-0,079
		ВНУ	-0,254	0,222	0,165	0,364

**Примітки:** зони екологічних умов росту та розвитку деревостанів: СУ – сприятливі ВСУ – відносно сприятливі, ВНУ – відносно несприятливі; способи розрахунку: N – за густиотою насаджень, V – за запасом стовбурної деревини, G – за сумою площ поперечних перерізів; жирним шрифтом виділені значення статистично значущих коефіцієнтів кореляції ( $P < 0,05$ ).

$Hr > Dr > Gr$ . Як і в попередньому випадку, серед індексів різноманіття індекс вирівняності Пієлу виявився найінформативнішим показником. Найявні індекси за вектором зменшення кількості випадків і силою кореляційного зв'язку розмістилися так:  $Eg > Ma > H' > E$ . Серед способів розрахунку, отримані за показниками запасів стовбурної деревини, індекси різноманіття також виявилися найінформативні. За вектором зменшення кількості випадків і силою кореляційного зв'язку способи розрахунку індексів різноманіття були в аналогічному попередньому ряду: за  $V > за N > за Ga$ . У сприятливих екологічних умовах встановлено максимальну кількість випадків і силу кореляційного зв'язку.

### Висновки і перспективи.

Деревостани садово-паркових культурфітоценозів Криворіжжя є відображенням науково-практичних досягнень часів свого створення. Для них притаманний збіднений флористичний склад (містять лише 23 види деревних рослин) і спрощена видова структура, що підтверджується розрахованими нами індексами різноманіття Сімпсона й Шеннона, вирівняності Пієлу та багатства Маргалєфа. Окрім того, у цих деревостанах у значній кількості виявлено інвазійно активні й небезпечні для природних екосистем, зокрема, види-трансформери, зокрема *Robinia pseudoacacia* й *Acer gundoo*.

Абсолютні і відносні дендрометричні показники деревостану підтверджують, що види деревних рослин садово-паркових культурфітоценозів Криворіжжя перебувають у стресовому стані внаслідок постій-

ного впливу несприятливих екологічних чинників натуралізованого (дефіциту вологи й потепління клімату) та антропогенного (забруднення довкілля) генезису. Такі чинники можуть спричинити передчасне старіння і зменшення фітомеліоративних функцій та екологічні послуги деревних рослин.

Між дендрометричними показниками та індексами різноманітності деревостанів садово-паркових культурфітоценозів Криворіжжя виявлено статистично значущий зв'язок, що підтверджується кореляційними розрахунками. Такі дендрометричні показники, як густина насаджень і запас стовбурної деревини були найчутливішими до значень індексів різноманітності деревостанів. Серед індексів різноманіття індекс вирівняності Пієлу був найінформативнішим показником. Тому, у перспективі доцільно продовжити розробку еколого-математичної моделі із залученням методів дисперсійного та регресійного аналізів.

### References

1. Bertram, C., & Rehdanz, K. (2015). The role of urban green space for human well-being Author links open overlay panel. *Ecological Economics*, 120, 139-152. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2015.10.013>
2. Haaland, C., & Konijnendijkvan den Bosch, C. (2015). Challenges and strategies for urban green-space planning in cities undergoing densification: a review. *Urban Forestry & Urban Greening*, 14 (4), 760-771. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2015.07.009>
3. Lykholat, Yu. V., Khromykh, N. A., Ivan'ko, I. A., Matyukha, V. L., Kravets, S. S., Didur, O. O., Alexeyeva, A. A., & Shupranova, L. V. (2017). Assessment and prediction of the invasiveness of some alien plants in conditions Assessment and prediction of the invasiveness

- of some alien plants in conditions of climate change in the steppe Dnieper region. *Bio-systems Diversity*, 25 (1), 52-59. <https://doi.org/10.15421/011708>
4. Savosko, V. M., Kvitko, M. O., Grygoryuk, I. P., Serga, O. I., Lykholat, Yu. W., & Andriś'o M. O. (2018). Heterohennist biometrychnykh pokaznykiv lisovykh kulturfitotsenoziv v ekolohichnykh umovakh Kryvorizhzhia [Heterogeneity of biometric characteristics of cultivated forest communities in environmental conditions at Kryvorizhzhya]. *Bioresursi i prirodokoristuvannâ [Biological Resources and Nature Management]*, 10 (1-2), 14-23. <http://dx.doi.org/10.31548/bio2018.01.002> (in Ukrainian)
  5. Derkzen, M.L., Teeffelen, A. J. A., Nagendra, H., & Verburg, P.H. (2017). Shifting roles of urban green space in the context of urban development and global change. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 29, 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.coust.2017.10.001>
  6. Savosko, V. M., & Kvitko, M. O. (2017). Suchasnyj zhyttyevyj stan lisovyx kulturfitotsenoziv Kryvorizhzhya [Modern life condition of forest kulturpflanzen Kry`vorizhzhya]. *Visnyk Lvivskogo universytetu Seriya biologichna [Visnyk of Lviv University Biological series]*, 75, 75-82. Retrieved from <http://publications.lnu.edu.ua/bulletins/index.php/biology/article/view/7987> (in Ukrainian)
  7. Booth, T. H. (2018). Species distribution modelling tools and databases to assist managing forests under climate change. *Forest Ecology and Management*, 430, 196-203. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.08.019>
  8. Jennifer R. W., Byrne, J., & Newell, J. P. (2014). Urban green space, public health, and environmental justice: The challenge of making cities 'just green enough'. *Landscape and Urban Planning*, 125, 234-244. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2014.01.017>
  9. Kabischabc, N., Strohbacha, M., Haasead, D., & Kronenberge, J. (2016). Urban green space availability in European cities. *Ecological Indicators*, 70, 586-596. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.02.029>
  10. Janhäll, S. (2015). Review on urban vegetation and particle air pollution – deposition and dispersion. *Atmospheric Environment*, 105, 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.01.052>
  11. Dobrochaeva, D. N., Kotov, M. Y., Prokudyn, Yu. N., & Barbarych, A. Y. (1999). *Opredelytel vysshykh rastenyi Ukrainy [A Guide to the Identification of higher plants from Ukraine]*. Fitosotsiotsentr. (in Russian)
  12. Hrom, M. M. (2005). *Lisova taksatsiia. [Forest Taxation]*. Ukrainian State Forestry University. (in Ukrainian)
  13. West, P. W. (2009). *Tree and Forest Measurement*. Springer-Verlag.
  14. IPNI, (2020). The International Plant Names Index. <http://www.ipni.org>.
  15. Shannon, C. E., Wiener W. (1949). *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press.
  16. Pielou, E. C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 13, 131-144.
  17. Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity. *Nature*, 163, 688.
  18. Margalef, R. (1958). Temporal succession and spatial heterogeneity in phytoplankton. In: A.A Buzzati-Traverso (ed.), *Perspectives in Marine biology* (pp. 323-347). University of California Press.
  19. McDonald, J. H. (2014). *Handbook of biological statistics*. Sparky house publishing.
  20. Savosko, V. M. & Tovstolyak N. V. (2016). Ekoloho–botanichna obumovlenist poshyrenosti derevno–chaharnykovykh vydiv u vyznachnykh parkakh ta skverakh istorychnoho tsentru Kryvorizhzhia [The ecological and botanical dependence of the tree and shrub species occurrence in outstanding parks and squares at Kryvorizhzhya historical centre]. *Introduktsiia roslyn [Plant introduction]*, 3 (71), 85-95. Retrieved from <https://www.plantintroduction.org/index.php/pi/article/view/126/118> (in Ukrainian)

21. Savosko, V. M., & Tovstolyak, N. V. (2017). Ecological conditions of garden and park territories of former iron mines (Kryvyi Rih Basin, Ukraine). *Ukrainian Journal of Ecology*, 7 (4), 12–17. Retrieved from <https://www.ujecology.com/articles/ecological-conditions-of-garden-and-park-territories-of-former-iron-mines-kryvyi-rih-basin-ukraine.pdf> (in Ukrainian)
22. Savosko, V. M., & Tovstolyak, N. V. (2018). Rozvytok i suchasnyi stan sadiv ta parkiv kolyshnykh zaliznykh rudnykiv Kryvorizhzhia [Development and modern state of gardens and parks of former iron mines at Kryvorizhzhia]. *Pytannia stepovoho lisoznavstva ta lisovoi rekultyvatsii zemel* [Issues of steppe forestry and forest reclamation of soils], 47, 54-63. <https://doi.org/10.15421/441807> (in Ukrainian)
23. Savosko, V. M., Tovstolyak, N. V., Lykholat, Yu. V., & Grygoryuk, I. P. (2019). Minlyvist botaniko-ekolohichnykh pokaznykiv derevostaniv sadovo-parkovykh kulturfitotsenoziv Kryvorizhzhia [Variability of botanical and ecological indicators of woodlands in gardens & parks cultivated plant communities at Kryvyi Rih District]. *Biological systems: theory and innovation*, 10 (3), 13-26. <http://dx.doi.org/10.31548/biologiya2019.03.013> (in Ukrainian)
24. Savosko, V. M., & Tovstolyak, N. V. (2019). Ekolohichni osoblyvosti suchasnoho stanu derevno-chaharnykovykh vydiv roslyn u sadakh i parkakh kolyshnykh zaliznykh rudnykiv Kryvorizhzhia [Ecological aspects of the tree and shrub plants species current state in gardens and parks of former iron mines at Kryvorizhzhia]. *Visnyk Lvivskoho universytetu Seriya biolohichna* [Visnyk of the Lviv University. Series Biology], 80, 105-117. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2019.80.12> (in Ukrainian)
25. Jorgensen, S. E. (2011). *Handbook of Ecological Models Used in Ecosystem and Environmental Management*. Taylor & Francis Group.
26. Fedorovskiy, V. D., Terlyga, N. S., Danylchuk, O. V., Yukhimenko, Yu. S., & Danilchuk, N. M. (2012). Mynule ta suchasne parkiv i skveriv centralnoji chastyny m. Kryvyi Rih [Past and modern parks and parks of the central part of the city of Kryvyi Rih]. *Ahrobiolohija* [Agrobiology], 8 (94), 169–171. Retrieved from <https://agrobiologiya.btsau.edu.ua/sites/default/files/visnyky/agrobiologiya/agro%2094.pdf> (in Ukrainian)
27. Fedorovskiy, V. D., Terlyga, N. S., Yukhimenko, Yu. S., Danilchuk, O. V., Danilchuk, N. M., & Lapteva, O. V. (2013). Vydovyj sklad ta zhyttjevyj stan derevno-chaharnykovoi' roslynnosti parkiv ta skveriv m. Kryvyi Rih [Specific composition and vital state of arboreal-shrub vegetation of parks and public gardens of Kryvyi Rih]. *Introdukciya Roslyn* [Plant Introduction], 3, 73-79. Retrieved from <https://www.plantintroduction.org/index.php/pi/article/view/308/292> (in Ukrainian)
28. Terlyga, N. S., Danylchuk, O. V., Yukhimenko, Yu.S., Fedorovskiy, V. D., & Danylchuk, N. M. (2015). Kultyvovana dendroflora parkiv i skveriv Kryvoho Rohu: istorychni aspekty formuvannya ta suchasnyj stan [Cultivated dendroflora of parks and parks of Kryvyi Rih: historical aspects of formation and modern state]. *Visnik Harkivskogo nacionalnogo agrarnogo universitetu. Seriâ Biologiâ* [The bulletin of Kharkiv national agrarian university. Sseries biology], 2 (35), 93-101. Retrieved from <https://knau.kharkov.ua/vsniuk-hnau-2015-vip-2.html> 2015.02.093-101.terlyga\_et\_al.pdf (in Ukrainian)
29. Zavalova, L. V. (2017). Vydy invaziynykh roslyn, nebezpechni dlia pryrodnoho fitoriznomanit-tia obiektiv pryrodno-zapovidnoho fondu Ukrainy [The most harmful invasive plant species for native phytodiversity of protected areas of Ukraine]. *Naukovyi visnyk Chernivetskoho universytetu. Biolohiia* (Biolohichni systemy) [Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological Systems)], 9 (1), 87-107. Retrieved from <https://doi.org/10.31861/bio-systems2017.01> (in Ukraine)
30. Shol, H. (2016). Analiz spontannoho elementu flory zelenykh nasadzen Kryvoho Rohu ta invaziina aktyvnist vydiv-introdutsentiv [Analysis of the spontaneous element of Kryvyi Rih

- green areas and invasive activity of introduced species]. *Visnyk Lvivskoho universytetu Serii biologichna [Visnyk of the Lviv University. Series Biology]*, 71, 96-106. Retrieved from <http://publications.lnu.edu.ua/bulletins/index.php/biology/article/view/4156> (in Ukraine)
31. Ivanchenko, O. Ie. (2013). *Inventaryzatsiia ta otsinka stanu derevnykh nasadzen parku im. M.I. Kalinina m. Dnipropetrovsk [Inventory and evaluation of tree plantations kalinin's park in Dnepropetrovsk]. Pytannia bioindykatsii ta ekolohii [Problems of bioindications and ecology]*, 18 (2), 211–226. Retrieved from <http://sites.znu.edu.ua/bioindication/issues/2013-18-2/20.pdf> (in Ukrainian).
  32. Kabar, A. M., & Martynova, N. V. (2017). *Vyvchennia stanu nasadzen parkiv im. Bolodi Dubinina ta im. L. V. Pysarzhevskoho v misti Dnipro [The study of urban parkland condition in the Parks of Volodya Dubinin and Pysarzhevsky in the Dnepr City]. Lisove i sadovo-parkove hospodarstvo [Forest and garden-park households]*, 12. Retrieved from <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Lis/article/view/9559> (in Ukrainian)
  33. Lakyda, P. I. Shvidenko, A. Z., Shhepashhenko, D. G., Vasylyshyn, R. D., Bilous, A. M., Lakyda, I. P., & Matushevych, L. M. (2013). *Biotychna produktyvnist lisiv Ukrainy v yevropejskomu ekoresursnomu vymiri [Biotic productivity of Ukrainian forests within european ecore-source dimension]. Bioresursy i pryrodokorystuvannya [Biological Resources and Nature Management]*, 5-6, 99-106. Retrieved from <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Bio/article/view/3264> (in Ukrainian)
  34. Lakyda, P. I. (2002). *Fitomasa lisiv Ukrainy [Phytomass of Forests at Ukraine]. Zbruch. (in Ukrainian)*
  35. Gamito, S. (2010). Caution is needed when applying Margalef diversity index. *Ecological Indicators*, 10, 550–551. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2009.07.006>
  36. Kaufman, S., Hauck, M., & Leuschner Ch. (2017). Comparing the plant diversity of paired beech primeval and production forests: Management reduces cryptogam, but not vascular plant species richness. *Forest Ecology and Management*, 400 (15), 58-67. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.05.043>
  37. Blood, A., Starr, G., Escobedo, F., Chappelka, A., & Staudhammer, C. (2016). How Do Urban Forests Compare? Tree Diversity in Urban and Periurban Forests of the Southeastern US. *Forests*, 7, 120, 1-5. <https://doi.org/10.3390/f7060120>
  38. Konijnendijk, C. C. (2018) A Forest of Diversity. In: *The Forest and the City. Future City* (vol. 9, pp. 185-194). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75076-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75076-7_13)
  39. Martins, B., & Pereira, A. N. (2018). Index for evaluation of public parks and gardens proximity based on the mobility network: A case study of Braga, Braganza and Viana do Castelo (Portugal) and Lugo and Pontevedra (Spain). *Urban Forestry & Urban Greening*, 34, 134-140. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2018.06.014>
  40. Liqueste, C., Cid, N., Lanzanova, D., Grizzetti, B., & Reynaud, A. (2016). Perspectives on the link between ecosystem services and biodiversity: the assessment of the nursery function. *Ecological Indicators*, 63, 249-257. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.11.058>
  41. Dan, Z., Haifeng, Z., Xingyuan, H., Zhibin, R., Chang, Z., Xingyang, Y., Zhixia, M., & Peijiang, W. (2016). Effects of forest type and urbanization on species composition and diversity of urban forest in Changchun, Northeast China. *Urban Ecosystems*, 19 (1), 455-473. <https://doi.org/10.1007/s11252-015-0473-5>
  42. Spake, R., & Doncaster, P. (2017). Use of meta-analysis in forest biodiversity research: key challenges and considerations. *Forest Ecology and Management*, 400 (15), 429-437. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.05.059>
  43. Santini, S. L., Belmaker, J., Costello, M. J., Pereira, H. M., Rossberg, A. G., Schipper, A. M., Ceausu, S., Dornelas, M., Hilbers, J. P., Hortal, J., Huijbregts, M. A. J., Navarro, L. M.,

- Schiffers, K. H., Visconti, P., & Rondinini, C. (2017). Assessing the suitability of diversity metrics to detect biodiversity change. *Biological Conservation*, 213, 341-350. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.08.024>
44. Livesley, S. J., Escobedo, F. J., & Morgenroth, J. (2016). The Biodiversity of Urban and Peri-Urban Forests and the Diverse Ecosystem Services They Provide as Socio-Ecological Systems. *Forests*, 7, 291, 1-5. <https://doi.org/10.3390/f7120291>
45. Vacek, Z. (2017). Structure and dynamics of spruce-beech-fir forests in Nature Reserves of the Orlické hory Mts. in relation to ungulate game. *Central European Forestry Journal*, 63, 23–34. <https://doi.org/10.1515/forj-2017-0006>
46. Ucar, Z., Bettinger, P., Merry, K., Siry, J., Bowker, J. M., & Akbulut, R. (2016). A comparison of two sampling approaches for assessing the urban forest canopy cover from aerial photography. *Urban Forestry and Urban Greening*, 16, 221-230. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ufug.2016.03.001>
47. Kim, G. (2016). Assessing urban forest structure, ecosystem services, and economic benefits on vacant land. *Sustainability*, 8, 679. <https://doi.org/10.3390/su8070679>
48. Ciesielski, M., & Sterenczak, K. (2019). Accuracy of determining specific parameters of the urban forest using remote sensing. *iForest - Biogeosciences and Forestry*, 12 (6), 498-5010. <https://doi.org/10.3832/ifer3024-012>
49. Verma, P., & Raghubanshi, A. S. (2018). Urban sustainability indicators: challenges and opportunities. *Ecological Indicators*, 93, 282-291. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.05.007>

**V. M. Savosko, N. V. Tovstolyak, Yu. V. Lykholat, I. P. Grygoryuk (2020). CORRELATION BETWEEN DENDROMETRIC INDICATORS AND STANDS DIVERSITY INDICES IN GARDENS & PARKS CULTIVATED PLANT COMMUNITIES AT KRYVYI RIH DISTRICT. BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 11(1): 12-27. <http://journals.nubip.edu.ua/>. <https://doi.org/10.31548/biologiya2020.01.012>.**

**Abstract.** For a natural environment phyto-optimization a correlation dependencies between dendrometric indicators and a stand diversity indices in gardens & parks cultivated plant communities at Kryvyi Rih district had been analyzed. In 22 research plots at 10 gardens & parks both field and desk studies were conducted by conventional methods. In each plot: floral composition has been documented; woody stems of diameter at breast height and woody height were measured; tree-density, basal area of the tree and volume of the tree were computed. The woodlands diversity indices (Shannon's diversity, Pielou's evenness, Simpson's diversity and Margalef's richness) were calculated by classical formulas

The taxonomic composition of the stand contained 23 species from 13 genera, 12 families and one department - Polotonosynye. The dendrometric indicators of the stand confirmed that forest species plants are in a stress state as a permanent impact result by adverse environmental factors that are natural and anthropogenic genesis. The correlated calculations confirmed that between the dendrometric indices and the stands indices diversity is a statistically significant relationship. Among the dendrometric indicators, the tree-density and volume of the tree were the most sensitive to the stands indices diversity. Among the diversity indices, Pielou's evenness index was the most informative indicator

**Keywords:** woodlands, gardens & parks cultivated plant communities, floristic composition, dendrometric indicators diversity indices and Kryvyi Rih district.

## БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МОРФОЛОГІЧНИХ ДИСОЦІАНТІВ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* *PV. ATROFACIENS*

**Л. М. БУЦЕНКО**, старший науковий співробітник

**Л. А. ПАСІЧНИК**, старший науковий співробітник

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України

**Ю. В. КОЛОМІЄЦЬ**, доцент кафедри екобіотехнології  
та біорізнноманіття

Національний університет біоресурсів і природокористування України

E-mail: [plant\\_path@ukr.net](mailto:plant_path@ukr.net)

Буценко Л. М. <http://orcid.org/0000-0002-3575-4289>

Пасічник Л. А. <http://orcid.org/0000-0002-5662-3106>

Коломієць Ю. В.: <http://orcid.org/0000-0002-1919-6336>

**Анотація.** За дії пестицидів збільшується частота появи морфологічно відмінних форм у фітопатогенних бактерій виду *Pseudomonas syringae*, що призводить до ускладнень у разі ізоляції збудників та їхньої ідентифікації за ознаками фенотипу. Метою роботи було вивчення біологічних властивостей S- і R-форм збудника базального бактеріозу пшениці *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Встановлено, що R-дисоціанти штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 та *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 за фізіолого-біохімічними властивостями не відрізнялися між собою і від вихідної S-форми цих штамів. R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 та *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 краще формують біоплівку порівняно з S-формою цих штамів, що забезпечує їм конкурентну перевагу під час формування популяцій у філосфері. Показано, що R-форми не втрачають вірулентних властивостей, які притаманні вихідній S-формі *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Збільшення в популяції *P. syringae* pv. *atrofaciens* кількості особин, що характеризуються підвищеною здатністю до формування біоплівки за збереження вірулентних властивостей, може посилювати ризик виникнення епіфітотій, спричинених цим збудником.

**Ключові слова:** фітопатогенні бактерії, *P. syringae* pv. *atrofaciens*, морфологічні дисоціанти, біоплівки, вірулентність.

### Актуальність.

На сьогодні в усьому світі дослідники зазначають усе більш загрозливе розповсюдження та зростання агресивності фітопатогенних бактерій [Sundin G.W., 2016; Abd-Alla M.H., 2011; Ignatov A.N., 2009]. Як одну із причин сплеску бактеріальних хвороб рослин розглядають господарську діяльність людини і, зокрема, широке застосування пестицидів в агроценозах. У наших попередніх дослідженнях було показано, що пестициди, які не мають значної антибактеріальної активності, здатні спричинювати мутагенний вплив на фітопатогенні бактерії та індукувати морфологічну дисоціацію з утворенням R- форм збудника базального бактеріозу пшениці [Butsenko L.M., 2017; Buletsa N.M., 2016].

Ксенобіотики є стрес-фактором, адаптація до якого може супроводжуватися зміною певних властивостей мікроорганізмів. Пристосувальні реакції до дії пестицидів виявляються в різноманітній корекції біохімічних та фізіологічних процесів, що, відповідно, забезпечує їхнє подальше існування за умов такого антропогенного навантаження [Gorbatova O.H., 2006; Stenersen J., 2004].

Одним із варіантів адаптаційних змін бактерій є морфологічна дисоціація клітин і колоній, зумовлена перебудовою поверхневих структур клітин [Milko E.U., 2007]. Дисоціація – це особливий, властивий лише бактеріям тип мінливості, за якого відбувається розщеплення в межах одного виду на S- і R-форми. Це явище вперше досліджували Е. Вейль і А. Фелікс (1917 р).

В основу цього розподілу покладені генетичні перебудови, що

призводять до зміни деяких властивостей (культуральних, антигенних, біохімічних). Так, S-форми (англ. Smooth – гладкий) частіше більш агресивні, володіють добре вираженими антигенними властивостями, мають капсулу, на середовищах утворюють гладкі блискучі колонії. R-форми (англ. Rough – грубий, нерівний) зазвичай менш агресивні, не мають капсули, формують великі шорсткі колонії [Novikov D.K., 2010]. Однак, S-форми є більш агресивними не для всіх видів бактерій. R-форми збудників сибірської виразки, туберкульозу й чуми є вірулентними [Novikov D.K., 2010]. Дисоціація зазвичай протікає в одному напрямку: від S- до R-форми, іноді через проміжні стадії утворення слизових колоній.

На сьогодні вважають, що морфологічна дисоціація бактерій складається з двох процесів: виникнення дисоціантів у результаті зміни генетичних властивостей клітини й селекція утворених варіантів під впливом зовнішніх чинників. Виникнення нових генотипів відбувається на основі спонтанних мутацій, переносу генетичного матеріалу й перебуванні геному всередині однієї клітини [Milko E.U., 2007]. Тобто, дисоціація може відбуватися під час перенесення генетичного матеріалу в процесі кон'югації, трансформації, трансдукції чи фагової конверсії. Але в цих випадках, окрім акцепторної клітини, обов'язкова наявність донора чи ДНК іншої клітини або фага. Це може відбуватися у відкритих системах, які вивчає медична та ґрунтова мікробіологія. Однак, за вирощування чистих культур мікроорганізмів у лабораторних умовах також спостерігають процес морфологічної дисоціації. Вважають, що головна роль у

таких випадках належить мігруючим генетичним елементам: транспозонам, плазмідам, помірним фагам [Milko E.U., 2007]. Якщо мутації, які супроводжують процеси вбудовування в нуклеоїд транспозонів, інсерційних елементів та інше, порушують функцію оперонів, що відповідають за синтез ліпополісахаридів, утворюються R-форми бактерій. Поява R-форм може бути пов'язана з перебудовою в елементах клітинної стінки або полісахаридної капсули зі зміною чи повною відсутністю ферментів біосинтезу цих клітинних структур унаслідок мутації [van den Broek D., 2005]. Такі мутації вважаються плейотропними, оскільки, крім змін у морфології колоній, спостерігається зниження вірулентності та характеру серологічної реакції мутантних форм [Seaton S.C., 2013].

Утворення S- і R-форм найбільш вивчене для збудників інфекційних хвороб людини. Встановлено, що S- та R-форми *Mycobacterium abscessus* характеризуються відмінностями у взаємодії з імунними клітинами макроорганізму, що зумовлює необхідність пошуку лікарських засобів та стратегій, які спрямовані як на знищення внутрішньоклітинної популяції збудника, так і на запобігання утворення ним позаклітинних структур, які дозволяють R-формам *M. abscessus* уникати фагоцитозу [Viljoen A., 2017].

Для фітопатогенних псевдомонасів також характерна природна мінливість популяції з розщепленням на різні морфотипи [Yakovleva L.M., 1978; Muras V.A., 1983]. Вважають, що у *Pseudomonas syringae* спонтанна втрата плазміди (90 МДа) призводить до втрати вірулентності і зміни морфології колоній [Milko E.U., 2007].

Різниці у вірулентних властивостях спонтанних S- та R-форм *P. syringae* не відмічали [Muras V.A., 1983].

Значення дисоціації полягає в отриманні бактеріями селективних переваг, що забезпечують їхнє існування в організмі людини або в зовнішньому середовищі. Відомо, що S-форми більш стійкі до фагоцитозу. R-форми, у свою чергу, більш стійкі до чинників навколишнього середовища.

Отже, явище дисоціації сприяє гетерогенності бактеріальної популяції, підвищує її стійкість, розширює межі виживання виду. Адже дисоціанти відрізняються не лише морфологічно, а й можуть мати відмінності патогенних, вірулентних, біохімічних властивостей [Milko E.U., 1991]. Утворення R-форм бактерій також ускладнює мікробіологічну діагностику спричинюваних ними хвороб [Novikov D.K., 2010; Clark A.E., 2015].

З огляду на це метою нашої роботи було вивчення біологічних властивостей S- та R- форм *Pseudomonas syringae* рв. *atrofaciens*, зокрема їхніх вірулентних властивостей, здатності формувати біоплівки, як одного з механізмів колонізації філосфери.

### Матеріали та методи досліджень.

Для здійснення досліджень використані два штами збудника базального бактеріозу пшениці, властивості яких наведено у таблиці 1.

Для отримання спонтанних морфологічних дисоціантів *P. syringae* рв. *atrofaciens* здійснювали розсів суспензії клітин відповідного штаму на картопляний агар (КА). Через 72 години культивування враховували кількість колоній S- та R-форми. Для подальших досліджень відбирали ко-

## 1. Характеристика штамів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*

Властивості	Вид, номер штаму	
	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9780
Походження штаму	Українська колекція мікро-організмів	Ізольовано із пшениці с. Подолянка
Серологічна приналежність	Серогрупа II	Серогрупа IV
Агресивність для пшениці	3–4 бали	1–2 бали

лонії S- та R-форми та здійснювали їхній повторний розсів на КА. Через 72 години культивування відбирали стабільні S- та R-форми. Морфологію і структуру колоній бактерій, що вирости на КА в чашках Петрі через кілька днів після посіву вивчали, спостерігаючи за допомогою лупи. Характеризували розмір колоній, форму, структуру й консистенцію, поверхню, профіль, краї, колір тощо [Klement Z., 1990].

Фізіолого-біохімічні властивості вивчали за використання тест системи NEFERMtest24MikroLaTEST®, ErbaLachema.

Для проведення реакції мікроаглютинації на предметне скло, нанесли краплю антисироватки до штаму відповідної серогрупи *P. syringae* у розведенні 1 : 10 або 1 : 20 і краплю фізіологічного розчину. У кожному краплю додавали невелику кількість біомаси бактерій до утворення ледь видимої каламуті. Через 1–2 хв. у разі позитивної реакції спостерігали склеювання бактерій у конгломерати. У контрольній краплі спостерігали лише рівномірну суспензію бактерій, без склеювання [Klement Z., 1990; Palyka V.P., 2017].

Для виявлення здатності бактерій до утворення біоплівки культивували досліджувані штами в 6-лункових поліпропіленових планшетах. У кожну лунку вносили 2 мл картопляного

бульйону (КБ) та додавали 0,5 мл суспензії бактеріальних клітин концентрацією  $10^8$  КУО/мл. Через 48 год відбирали суспензію планктонних клітин і спектрофотометрично за довжини хвилі 540 нм визначали накопичення біомаси. Біоплівку, що утворилася на дні лунки, обережно промивали 0,85 % розчином хлориду натрію та фіксували 96 %-ним етанолом 10 хв. Фарбували біоплівку водним розчином кристалічного фіолетового. Планшет із забарвленою біоплівкою просушували 24 год за кімнатної температури та здійснювали лізис біоплівки заливаючи в кожну лунку по 2 мл розчину, який містив 0,1 н NaOH і 1 % додецилсульфату натрію (ДСН). Витримували планшети 1,5 год. Інтенсивність формування біоплівки визначали вимірюючи оптичну густину дослідного й контрольного зразків за довжини хвилі 592 нм [Galkin M.V., 2010]. Здатність формувати біоплівку на межі розподілу фаз повітря - рідина визначали візуально за культивування дисоціантів у картопляному бульйоні.

Здатність *P. syringae* індукувати реакцію надчутливості визначали за допомогою метода ін'єкцій-інфільтрацій на листках *Nicotiana tabacum* [Klement Z., 1990]. Для цього під епідерміс листків вводили суспензію клітин дводобових культур досліджуваних штамів бактерій концентрації-

єю  $1 \times 10^7$  КУО/мл. Суспензію клітин готували на стерильній водогінній воді. Як негативний контроль під епідерміс листків вводили стерильну водогінну воду. Наявність некрозів спостерігали через добу.

Вірулентні властивості S- та R-дисоціантів *P. syringae* pv. *atrogena* оцінювали за штучної інокуляції рослин пшениці у фазі трьох – чотирьох справжніх листків у вегетаційному будиночку за природного освітлення у весняний період. Результати штучного зараження враховували за розробленою нами шкалою [Патука V.P., 2017].

### Результати дослідження та їх обговорення.

За культивування штамів фітопатогенних бактерій *P. syringae* pv. *atrogena* на картопляному агарі спостерігали утворення колоній двох видів: типової S-форми (гладкі, блискучі, з припіднятим центром і рівними чи слабо хвилястими краями) та видозміненої R-форми колоній (шорсткі, матові, плоскіші та більші, з нерівними краями) (рис. 1).



Рис. 1. Колонії R- форми *P. syringae* pv. *atrogena* UKM B-1011.

Для *P. syringae* pv. *atrogena* частота спонтанної морфологічної дисоціації не перевищувала  $10^{-3}$ , що є характерним для бактерій цього виду. Оскільки, на нашу думку, утворення морфологічних дисоціантів збудника базального бактеріозу пшениці може бути одним із механізмів, що дозволяє фітопатогену краще адаптуватися до сучасних агрофітоценозів, у яких завжди присутні пестициди, необхідно було вивчити біологічні властивості його морфологічних дисоціантів.

Відомо, що морфологічна дисоціація призводить не лише до зміни зовнішнього виду колоній бактерій, а й до зміни їхніх фізіолого-біохімічних властивостей, може впливати на їхню здатність виживати в довкіллі, колонізувати різні поверхні, змінювати вірулентні властивості [Milko E.U., 2007; Tareb R., 2015; Cevallos-Cevallos J.M., 2012].

За вивчення біологічних властивостей морфологічних дисоціантів ми встановили, що R-дисоціанти штамів *P. syringae* pv. *atrogena* UKM B-1011 та *P. syringae* pv. *atrogena* 9780 за фізіолого-біохімічними властивостями не відрізнялися між собою і від вихідної S-форми цих штамів (табл. 2). Вони були оксидазонегативними, не редукували нітрати, не утворюють сірководню і індолу. S- та R-форми бактерій незначно відрізняються між собою за утилізацією галактози (табл. 2).

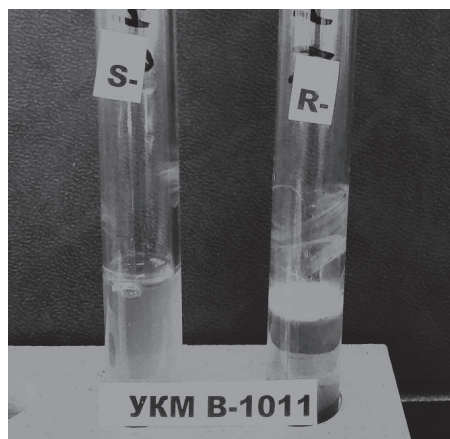
R-форми *P. syringae* pv. *atrogena* UKM B-1011 та *P. syringae* pv. *atrogena* 9780 краще формують біоплівку на поліпропіленових планшетах у порівнянні з S-формою цих штамів (табл. 3). Так, маса біоплівки R-форми *P. syringae* pv. *atrogena* UKM B-1011 була більша в 3,6 рази, а R-форми *P. syringae* pv. *atrogena*

**2. Фізіолого-біохімічні властивості S- та R-форм *P. syringae* pv. *atrofaciens***

Тест	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011		<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9780	
	S- форма	R- форма	S- форма	R- форма
Редукція нітратів	–	–	–	–
Утворення індолу	–	–	–	–
Утворення сірководню	–	–	–	–
Оксидаза	–	–	–	–
Уреаза	–	–	–	–
Аргінін	–	–	–	–
Орнітин	+	+	+	+
Лізин	+	+	+	+
Ацетамід	–	–	–	–
β-глюкозидаза	+	+	+	+
N-ацетил-β-D-глюкозаміддаза	–	–	–	–
Цитрат Сімсона	+	+	+	+
Лактоза	–	–	–	–
Манітол	–	–	–	–
Трегалоза	–	–	–	–
Ксилоза	–	–	–	–
Арабіноза	–	–	–	–
α-галактозидаза	–	–	–	–
β-галактозидаза	–	–	–	–
Малонат	–	–	–	–
Галактоза	–	+	+	–
Мальтоза	–	–	–	–
Целлобіоза	–	–	–	–
Сахароза	+	+	+	+
Інозітол	–	–	–	–
γ-глутамілтрансфераза	+	+	+	+
Фосфатаза	–	–	–	–
Ескулін	+	+	+	+

**3. Накопичення біомаси у планктонній культурі та біоплівці S- і R-формами *P. syringae* pv. *atrofaciens***

Досліджувана культура	Накопичення біомаси у планктоні, E540	Біомаса біоплівки, E592
S-форма <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	0,65 ± 0,03	0,32 ± 0,04
R-форма <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	0,58 ± 0,02	1,17 ± 0,19
S-форма <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9780	0,68 ± 0,02	0,42 ± 0,07
R-форма <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9780	0,56 ± 0,01	0,97 ± 0,03



**Рис. 2. Біоплівка на межі розподілу фаз повітря – рідина.**

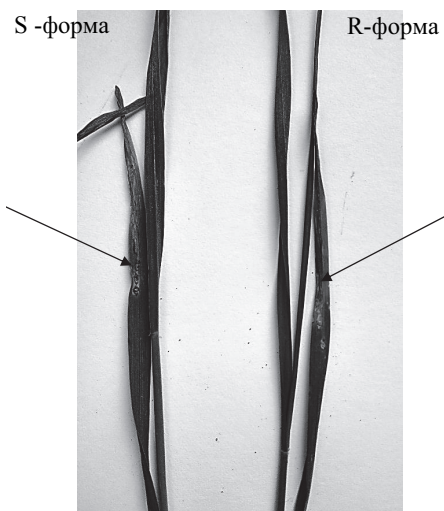
9780 – більша у 2,3 раз у порівнянні з масою біоплівки, сформованою S-формою (табл. 3).

Необхідно зазначити, що R-форма *P. syringae* pv. *atrogena* UKM B-1011 на відміну від S-форми цього штаму здатна формувати біоплівку на межі розділу фаз повітря – рідина (рис. 2), що також свідчить про підвищену здатність до утворення біоплівок у R-форм збудника базального бактеріозу.

*P. syringae* добре відомий епіфіт. Він є звичайним мешканцем філосфери й демонструє добру адаптованість до виживання в цій екологічній ніші. Дослідники вважають, що саме великі епіфітні популяції *P. syringae* є первинним інокуломом за інфікування рослин [Tarkowski P., 2014; Hirano S.S., 2000]. Відомо, що однією із характеристик бактерій, які можуть ефективно колонізувати філосферу, є здатність до формування біоплівки на поверхні рослини [Mann E.E., 2012; Dwivedi D., 2017]. Встановлено, що вірулентність штамів *P. syringae* корелює із їхньою здатністю продукувати альгінат, який може бути ос-

новним компонентом біоплівки [Laue H., 2006]. Також важливим для утворення біоплівки є інший полісахарид, що утворюється штамми *P. syringae* – леван [Laue H., 2006]. На думку вчених, відчуття кворуму та утворення біоплівки, разом із рухливістю і здатністю до хемотаксису забезпечує можливість акумулювання поживних речовин та води, що є передумовою успішної колонізації та проживання бактерій у філосфері [Cheng F., 2017; Urooj F., 2015].

За штучної інокуляції рослин пшениці сорту Печерянка S- та R- формою *P. syringae* pv. *atrogena* UKM B-1011 виявляли однаковий розвиток симптомів бактеріозу (рис. 3).



**Рис. 3. Симптоми ураження на пшениці сорту Печерянка за штучної інокуляції S- та R-формою *P. syringae*pv. *atrogena* UKM B-1011.**

Отже, ми встановили, що R-форми не втрачають вірулентних властивостей, які притаманні вихідній S-формі фітопатогенних бактерій виду *P. syringae* pv. *atrogena*.

## Висновки та перспективи.

Збуднику базального бактеріозу пшениці притаманна морфологічна дисоціація з утворенням видозміненої R-форми колоній (шорсткі, матові, плоскіші та більші, з нерівними краями). S- та R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* не відрізняються за фізіолого-біохімічними властивостями та вірулентністю. Водночас R-форми цих фітопатогенних бактерій характеризуються підвищеною здатністю до формування біоплівки. На нашу думку, збільшення в популяції *P. syringae* pv. *atrofaciens* кількості особин, що характеризуються підвищеною здатністю до формування біоплівки, може призводити до формування більших популяцій цього збудника на рослинах-хазяїнах та посилювати ризик виникнення епіфітотій. Наявність R-форм у популяції збудника призводить до ускладнень під час діагностики базального бактеріозу.

## References

1. Sundin, G.W., Castiblanco, L.F., Yuan, X., Zeng, Q. & Yang, C.H. (2016) Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects: Challenges in Bacterial Molecular Plant Pathology. *Mol Plant Pathol*, 17(9), 1506–1518. DOI:10.1111/mpp.12436.
2. Abd-Alla, M.H. & Bashandy, S.R. (2011) Progress in phytopathogenic bacteria: isolation and characterization. LAP LAMBERT Academic Publishing, 216 p.
3. Ignatov, A.N., Punina, N.V., Matveeva, E.V., Kornev, K.P., Pekhtereva, E.S. & Polityko, V.A. (2009) New causative agents of bacteriosis and the prognosis of their spread in Russia. *Plant Protection and Quarantine*, 4, 38–41.
4. Butsenko, L.M., Pasichnyk, L.A., Buletsa, N.M. & Patyka, V.P. (2017) The effect of the Alpha super insecticide on phytopathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* agrophytocenoses of wheat. *Bulletin of agricultural science*, 3, 18–22.
5. Buletsa, N.M., Butsenko, L.M., Pasichnyk, L.A. & Patyka, V.P. (2016) Growth physiology of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* for the action of pesticides. *Microbiological journal*, 78(3), 52–60.
6. Gorbatova, O.H., Zherdev, A.B. & Queen, O.B. (2006) Triazine pesticides: structure, effect on living organisms, degradation processes. *Advances in biological chemistry*, 46, 323–348.
7. Stenersen J. (2004) Chemical pesticides: mode of action and toxicology. CRC Press LLC, 296 p.
8. Milko, E.U., Kotova, I.S. & Netrusov, A.I. (2007) The process of dissociation in bacteria. M.: MAX Press, 68 p.
9. Novikov, D.K., Generals, I.I., Daniushchenkova, N.M., Zheleznyak, N.V., Kardovich, G.A. & Okulich, V.K. (2010) Medical microbiology with practical skills, situational tasks, control test tasks. Vitebsk: Voronezh State Medical University, 562 p.
10. van den Broek, D., Bloemberg, G.V. & Lugtenberg, B. (2005) The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas* bacteria. *Environ. Microbiol.*, 7(11), 1686–1697. DOI:10.1111/j.1462-2920.2005.00912.x
11. Seaton, S.C., Silby, M.W. & Levy, S.B. (2013) Pleiotropic effects of GacA on *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 in vitro and in soil. *Appl Environ Microbiol.*, 79(17), 5405–5410. DOI: 10.1128/AEM.00819-13
12. Viljoen, A., Herrmann, J.-L., Onajole, O.K., Stec, J., Kozikowski, A.P. & Kremer, L. (2017) Controlling extra- and intramacrophagic *Mycobacterium abscessus* by targeting mycolic acid transport. *Front Cell Infect Microbiol.*, 7, 388. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00388

13. Yakovleva, L.M., Pastushenko, L.T., Simonovich, I.V. & Stepanyuk, B.B. (1978) Dissociation of some phytopathogenic bacteria of the genus *Pseudomonas*. *Microbiol. Journal*, 40(5), 596–600.
14. Muras, V.A., Gvozdyak, R.I., Zhitkevich, N.V. & Azimtsev, A.G. (1983) The natural variability of the morphological, biochemical, and pathogenic properties of collection cultures of phytopathogenic bacteria. *Microbiol. Journal*, 45(5), 36–42.
15. Milko, E.U. & Egorov, N.A. (1991) The heterogeneity of the bacterial population and the process of dissociation. M.: Publishing House of Moscow State University, 144 p.
16. Clark, A.E. (2015) The occupational opportunist: an update on *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection, disease pathogenesis, and microbiology. *Clinical Microbiology Newsletter*, 37(18), 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2015.09.001>
17. Klement, Z., Rudolph, K. & Sands, D. (1990) *Methods in phytobacteriology*. Budapest: Academia Kiado, 568 p.
18. Patyka, V. P. (Ed) (2017) *Fitopatohenni bakterii. Metody doslidzhennia*. [Phytopathogenic bacteria. Research methods] Vinnytsia: TOV Vindruk, 432 p.
19. Galkin, M.B., Vodzinsky, S.V., Kirichenko, G.M. & Ivanitsa, P.O. (2010) Peculiarities of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 biofilm formation under the dark and photo-induced effects of bismuth-room porphyrins. *Microbiology and biotechnology*, 3, 51–60.
20. Tareb, R., Bernardeau, M., Horvath, P. & Vernoux, J.P. (2015) Rough and smooth morphotypes isolated from *Lactobacillus farciminis* CNCM I-3699 are two closely-related variants. *Int. J. Food Microbiol.*, 193(16), 82–90. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.036
21. Cevallos-Cevallos, J.M., Gu, G., Danyluk, M.D. & van Bruggen, A.H. (2012) Adhesion and splash dispersal of *Salmonella enterica* typhimurium on tomato leaflets: effects of rdar morphotype and trichome density. *Int. J. Food Microbiol.*, 160(1), 58–64. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.021
22. Tarkowski, P. & Vereecke, D. (2014) Threats and opportunities of plant pathogenic bacteria. *Biotechnology Advances*, 32, 215–229. DOI:10.1016/j.biotechadv.2013.11.001
23. Hirano, S.S. & Upper, C.D. (2000) Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 64, 624–653. DOI:10.1128/membr.64.3.624-653.2000
24. Mann, E.E. & Wozniak, D.J. (2012) *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev.*, 36(4), 893–916. DOI:10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x.
25. Dwivedi, D., Khare, M., Chaturvedi, H. & Singh, V. (2017) Plant pathogenic bacteria: role of quorum sensing and biofilm in disease development. In: *Biofilms in plant and soil health*, first edition. Edited by Iqbal Ahmad and Fohad Mabood Husain. John Wiley & Sons Ltd., 387–407. DOI:10.1002/9781119246329.ch20
26. Laue, H., Schenk, A., Li, H., Lambertsen, L., Neu, T.R., Molin, S. & Ullrich, M.S. (2006) Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology*, 152, 2909–2918. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28875-0>
27. Cheng, F., Ma, A., Luo, J., Zhuang, X. & Zhuang, G. (2017) N-acylhomoserine lactone-regulation of genes mediating motility and pathogenicity in *Pseudomonas syringae* pathovar *tabaci* 11528. *Microbiologyopen*, 6(3), e00440. DOI:10.1002/mbo3.440.
28. Urooj, F. & Senthil-Kumar, M. (2015) Plant and pathogen nutrient acquisition strategies. *Frontiers in Plant Science*, 6, 750. DOI:10.3389/fpls.2015.00750

**L.M. Butsenko, L.A. Pasichnyk, Y.V. Kolomiets (2020). BIOLOGICAL PROPERTIES OF MORPHOLOGICAL DISSOCIANTS PSEUDOMONAS SYRINGAE PV.**

**ATROFACIENS. BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 11(1): 28-37.**

<http://journals.nubip.edu.ua/>.

<https://doi.org/10.31548/biologiya2020.01.028>

**Abstract.** Annotation. Under the action of pesticides, the frequency of occurrence of morphologically different forms in phytopathogenic bacteria of the species *Pseudomonas syringae* increases, which leads to complications in the isolation of pathogens and their identification by phenotype. The aim of the work was to study the biological properties of S- and R-forms of the causative agent of basal wheat bacteriosis *P. syringae* pv. *atrofaciens*. It was established that R-disociants of *P. syringae* pv. *atrofaciens* UKM B-1011 and *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 in physiological and biochemical properties did not differ from each other and from the initial S-form of these strains. R-forms of *P. syringae* pv. *atrofaciens* UKM B-1011 and *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 better forms a biofilm compared to the S-form of these strains, provides them with a competitive advantage in the formation of populations in the phyllosphere. It was shown that the R-forms do not lose the virulent properties inherent in the original S-form of *P. syringae* pv. *atrofaciens*. An increase in the population of *P. syringae* pv. *atrofaciens* the number of individuals characterized by an increased ability to form biofilms while maintaining virulent properties, may increase the risk of epiphytiosis caused by this pathogen.

**Keywords:** phytopathogenic bacteria, *P. syringae* pv. *atrofaciens*, morphological dissociants, biofilms, virulence

---

## ACCUMULATION OF $^{137}\text{CS}$ IN INSECTS – HERPETOBIONT INTEGUMENTS

---

---

*D. Monoshyn<sup>1</sup>, T. Shupova<sup>2</sup>, L. Rudchenko<sup>1</sup>, V. Gaychenko<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup> National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine*

*<sup>2</sup> Institute of Evolution Ecology NAS Ukraine*

**Abstract.** *The study of the radioactivity of insects - herpetobiont elytra that belong to different trophic groups shown the presence of incorporated  $^{137}\text{Cs}$ , there were concentrated about 20% of total animal radioactivity. The comparison of the radionuclide comparison was done in both dried and fresh samples. Radioactive contamination of integument comes mainly from the terminal phase of metamorphosis (at the ninth phase).*

**Keywords:** *insects - herpetobiont, insect integument,  $^{137}\text{Cs}$ , accumulation of radionuclides*

---

In nearest future, the questions of intake, accumulation, biological transformation, and redistribution of the radioactive compounds by domestic and wild animals are not going to escape careful look of radiobiology and radioecology. Especially important place in this question is taken by the study of the radioactive contamination of invertebrates, especially of insects. These animals are characterized by a relatively short life cycle, high fertility, and biomass. They have taken almost all biological niches, which makes them ones that have important (or even main) influence in the transformation of matter and energy at the natural or half-natural ecosystems. It also allows us to use them as the object of ecological and, especially, radioecological monitoring [1].

The insect with the different trophic specializations, collected from Drevlyany radioecological reserve (Zytomirska oblast, Ukraine, the density of radioactive contamination of soil is more than 25 kBq/m<sup>2</sup>) at 2017 served as material for the study. The activity of recently sampled and dry material was analyzed. To determine the activity of  $^{137}\text{Cs}$  in integuments elytra were studied.

Collected samples were shredded, measurements were done using Gamma - spectrometry equipped with Ge(Li) half conducting detector GEM-30185, GMX (EG&G ORTEC) and multichannel analyzer (ADCAM-300, USA, IN-1200, France). To perform the analysis, the measuring vessels “Denta” (shape

of a frustum, 3.3cm high, 6.3 and 7.3 cm diameter of bases). Measurement has been done in the Institute of Agricultural Radiology NULES Ukraine.

The insects - herpetobionts of different ecological groups were studied: phytophagous (*Zabrus tenebrioides* Goeze, 1777, *Melolontha melolontha* L. 1758), predators (*Calosoma inquisitor* L. 1758, *Calosoma auropunctata* Herbst, 1874), detritophages (*Nicrophorus vespillo* L. 1758), and coprophagous (*Geotrupes stercorarius* L. 175).

Results of the measurements showed that in all cases integument is characterized by a relatively high level of radioactive contamination (Table 1). A high observational error may be explained by the low weight of samples.

As previous researches showed, redistribution of  $^{137}\text{Cs}$  in the trophic chain (from phytophagous and up to coprophagous) for insects is following the same pattern that known for other animals - increasing of concentration along with the moving to the higher point on the trophic chain [4, 5, 7].

Since dry entomological material was used for the research, fresh samples of *Melolontha melolontha* L. in

situ (whole body and elytra only) were used as a control and to compare the contamination level (Table 2). As can be seen from the table, the activity of “fresh” *Melolontha melolontha* and their elytra shows that insect integument contains about 26% of total animal radioactivity. The suggestion that other studied insect species following the same or at least similar relation was taken as a working hypothesis.

On the modern state of radioactive contamination of the forests of Ukrainian Woodland, the main place where radionuclides are accumulating is forest floor and topsoil [6], which are ecological niches for the majority of the species of insects - herpetobiont. The main way of radioincludes income is the trophic one since larvae and imagoes intake contaminated fodder and accumulate biologically significant radionuclides, such as  $^{137}\text{Cs}$ . Radioactivity of insects integuments requires more attention since it is not yet described in the literature.

Radioactive contamination of insect integument occurs while it is forming at the larva phase, which is characterized by high activity of potassium [8,

**Table 1. Activity of insect integuments.**

Specie	Trophic specialization	Mass of the sample, g	Activity, Bq/kg	Observation error, %
<i>Calosoma inquisitor</i>	Predator	5,914	540	15
<i>Calosoma auropunctata</i>	Predator	24,21	3335	10
<i>Zabrus tenebrioides</i>	Phytophagous	4,992	600	22
<i>Nicrophorus vespillo</i>	Necrophagous	4,813	630	15
<i>Geotrupes stercorarius</i>	Coprophagous	10,587	1510	12

**Table 2. Activity of whole *Melolontha melolontha* and their elytra.**

	Weight of the sample, g	Activity, Bq/Kg	Observation error, %
Elytra	12,642	400	14
Whole insect	39,85	1500	9

9], whose chemical analysis is  $^{137}\text{Cs}$ . A relatively low amount of radionuclide comes to an animal at the imago stage, but, according to authors, it concentrates on fat and tissues.

Taking to account significant biomass of entomofauna and its important role in the migration of radionuclides at the natural ecosystems, peculiar properties of redistribution of  $^{137}\text{Cs}$  by the insects - herpetobionts, as well as its partition in the organs and tissues of animals require future investigation.

#### References:

1. Gaychenko V.A. Faunistic complex as an object of radioecological monitoring // Nuclear physics and energy. 2013. Vol.14, Iss. 1, p. 51–54.
2. Romanenko V.N. Fundamentals of the comparative physiology of invertebrates. – Tomsk: Tomsk State University. –2013. 224 p.
3. Comparative physiology of animals. Ed. L. Prosser. –M.: 1977 T.1. 608 p.
4. V. Gaychenko, D. Monoshyn. Redistribution of  $^{137}\text{Cs}$  in trophic chains of insects-herpetobions. // Science Newsletter NUBIP of Ukraine. Seriya "Biology, Biotechnology, Ecology". –2018, Vol. 287. P. 7-14.
5. V.A. Gaychenko, V.D. Naumova. Migratsiya  $^{137}\text{Cs}$  of the Chornobilsky similarity according to the trophic lancet of the pastoral type. // Mat. scientific-practical conference up to 120 riches NUBIP of Ukraine. – K.: – 2018). p. 70 - 73.
6. Krasnov V.P., Shelest Z.M., Kurbet T. V, Boiko O. L.  $^{137}\text{Cs}$  redistribution in time in wet bory and sugrudy soils in Forests of Ukrainian Polissia // Nuclear physics and atomic energy. –2016, Vol. 17, Iss. 2. p. 394–399. doi:org/10.15407/jnpae2016.01.063
7. Simonova L.I., Gaychenko V.A. Biogenic  $^{137}\text{Cs}$  migration in trophic lanceugs // Ukrainian Radiological Journal. – 2009, Vol. 2. p. 218–220
8. Arthur M. Jungreis, William R. Harvey Role of active potassium transport by integumentary epithelium in secretion of larval-pupal molding fluid during silkmoth development // J. exp. Biol. –1975), Vol. 6a, p. 357-366 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065280608600521>).
9. Arthur M. Jungreis Physiology of Moulting in Insects // Advances in Insect Physiology.–1979, Vol.14. p. 109-183, <https://www.semanticscholar.org/paper/Role-of-active-potassium-transport-by-integumentary-Jungreis-Harvey/c80d20e-d043755a9dbf7fbddb9dd87b4eddcecea>

**Д. Моношин, Т. Шупова, Л. Рудченко, В. Гайченко(2020). НАКОПИЧЕННЯ  $^{137}\text{CS}$  В ПОКРИВАХ КОМАХ-ГЕРПЕТОБІОНТІВ. BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 11(1): 38-41. <http://journals.nubip.edu.ua/>. <https://doi.org/10.31548/biologiya2020.01.038>**

**Анотація.** На сучасному етапі радіоактивного забруднення лісів Полісся України, основним місцем накопичення радіонуклідів є лісова підстилка і верхній шар ґрунту, який і є екологічною нішею переважної більшості видів комах-герпетобіонтів. Основним шляхом надходження радіонуклідів є трофічний – личинки комах та імаго живляться радіоактивно забрудненим кормом і накопичують біологічно значущі радіонукліди, зокрема  $^{137}\text{Cs}$ . Звертає на себе увагу радіоактивність зовнішніх покривів імаго, яка в доступній авторам літературі не описана.

Радіоактивне забруднення зовнішніх покривів комах відбувається під час його формування на стадії лялечки, для якої характерною є висока активність калію, хімічним анало-

гом якого є  $^{137}\text{Cs}$ . Порівняно невелика кількість радіонукліду надходить до тварини шляхом живлення імаго, проте, на думку авторів, він концентрується лише в м'яких тканинах і жировому тілі.

Вивчення питомої радіоактивності елітр комах-герпетобіонтів різних трофічних груп виявило наявність у них інкорпорованого  $^{137}\text{Cs}$  – приблизно 20 % від загальної радіоактивності тварин. Проведене порівняння вмісту радіонукліду у висушених та свіжих зборах. Формування радіоактивного забруднення покривів імаго відбувається на термінальній стадії метаморфозу – стадії лялечки. З огляду на значну біомасу ентомофауни та її важливу роль у міграції радіонуклідів у природних екосистемах, особливості перерозподілу комахами-герпетобіонтами  $^{137}\text{Cs}$ , а також розподіл радіонуклідів органах і системах органів тварин потребують подальшого дослідження.

**Ключові слова:** комах-герпетобіонти, покриви комах,  $^{137}\text{Cs}$ , накопичення радіонуклідів.

---

---

## ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF CULTURAL FILTRATES OF SOME STRAINS OF MICROMYCETE

---

**I.G. RUBEZHNIAK**

*National University of Life and Environmental sciences of Ukraine  
Kyiv Ukraine*

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1875-8963>

**Annotation.** *The purpose of this work was conducting study of the antibacterial activity of cultural filtrates of 125 micromycete strains isolated from different samples. Different Gram-negative and Gram-positive bacteria as test-organisms have been applicable. Activity of 64 strains has been established. Genus *Aspergillus* and *Penicillium* was characterized wide spectrum of activity. The strains of genus *Aureobasidium* and *Paecilomyces* as *A. pullulans* 41, *P. variotii* 68 have been shown antibacterial action against test-organisms. It is found that strains of *M. vinacea* exhibited antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* 904 and *E. coli* 906. Most strains did not show antibacterial effect. The results obtained confirm that antibacterial potential of strains of *A. pullulans*, *P. variotii* and *M. vinacea* is the most potential for researches of biologically active substances.*

**Keywords:** *micromycetes, antibacterial activity, Gram-negative bacteria, Gram-positive bacteria*

---

### ***Introduction.***

The micromycetes have been famous as producers of antibiotics and other secondary biologically active metabolites as vitamins, attractants, cytotoxins, insecticides, compounds that promote or inhibit growth, etc. [1, 2]. The strains of micromycetes have been traditionally used to produce a variety of important substances for the pharmaceutical and food industries.

System researches concerning ability to produce the biologically active substances were conducted by different authors on the separate strains of molds [2, 3]. Wide potential of micromycetes had not been fully

studied up to now. Screening of novel strains are bringing about microorganisms, not yet fully assayed for their antibacterial activity that can produce useful templates with new antibiotics activity.

The purpose of our work was study of antibacterial activity of cultural filtrates of 125 micromycete strains as a starting point for further investigations of the most perspective strains for feasible obtaining of antibacterial substances.

### ***Materials and methods.***

In this work it was used 125 micromycete strains of the genus *Aspergillus*, *Alter-*

*narina*, *Aureobasidium*, *Beauveria*, *Botrytis*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Endomyces*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Mortierella*, *Nigrospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pseudallescheria*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Ulocladium* and separate strains *Nectria* sp., *Phialophora* sp. and *Verticillium dahlia*, which were isolated from different ecological niches such as air, dwelling walls, soil of Chernigovska area and rhizosphere of plants.

The micromycetes were grown on a basic nutritive Czapek medium [5]. The culture liquid filtrates were tested against Gram-positive bacteria as *Staphylococcus aureus* 904, *Bacillus licheniformis* 5 and Gram-negative bacteria as *Escherichia coli* 906, *Agrobacterium tumefaciens* 8464, *Pectobacterium carotovorum* 8636. *A. tumefaciens* causes crown gall disease on various plant species and *P. carotovorum* is a ubiquitous plant pathogen with a wide host range (carrot, potato, tomato, leafy greens, etc.). *B. licheniformis* 5 is a bacterium that is commonly found in soil and bird feathers. These bacteria are known to cause food poisoning and food spoilage. *E. coli* lives in the intestines of humans and helps keep our guts healthy. But certain strains of *E. coli* can cause severe illness such as urinary tract infections and neonatal sepsis, represent a huge public health problem. Bacteria *S. aureus* is a human pathogen that causes a wide variety of different infections. Bacterial test organisms have been incubated on the medium of agarose gel for 24 hours at 28 ° C.

The screening study of culture liquid filtrate of micromycete strains using standard agar well diffusion method was followed. Eight-millimeter diameter wells were cut from the agar using a sterile cork-borer and 100 µl of filtrate were delivered into the wells [5]. A di-

ameter of inhibition zones of bacteria was measured after 18-24 hours.

Bacterial strains were collected from the Department of Physiology and Taxonomy of Micromycetes, Danylo Zabolotny Institute Microbiology and Virology NAS of Ukraine.

## Results.

It can be seen in table 1 that only 64 from 125 strains shown antibacterial activity and inhibit the growth of test organisms. Among them, strains such as *A. pullulans* 41, *P. variotii* 68, *P. brevicompactum* 144 have a broad spectrum of antibiotic activity against both phytopathogenic bacteria and non-phytopathogenic bacteria. The separate strains such as *A. ustus* 103, *A. terreus* 119, *T. viride* 120 and the strains of the genus *Penicillium* as *P. aculeatum* 121, *P. ochrochloron* 145 and *P. purpurogenum* 143 showed activity against four from live examined bacteria. The majority strains exhibited antibacterial activity against three different bacteria.

The study of antibiotic effect of micromycete strains against *B. licheniformis* 5 indicated that *A. alleaceus* 118, *A. versicolor* 56, *A. pullulans* 43-46, *C. cladosporioides* 8, *G. virens* 39, *C. inaequalis* 84, *F. merismoides* 151, *M. vinacea* 62, 81-82, *P. variotii* 67, 69, *T. harzianum* 157 and separate strains of the genus *Penicillium* as *P. funiculosum* 2, *P. chrysogenum* 163 and *P. rubrum* 91 didn't visualize antibacterial effect. Other strains inhibited growth of *B. licheniformis* 5 (inhibition zone from 24 to 8,7 mm).

The result of study indicated that strains as *A. versicolor* 56, *F. solani* 128, *M. vinacea* 81-82 inhibited the growth of human pathogen strain *E. coli* 906 only (zone of inhibition from 25 to 11 mm).

The separate strains such as *A. alleaceus* 118, *A. pullulans* 43-46, *P. rubrum* 91 displayed antibiotic activity against *P. carotovorum* only. These strains didn't show antibiotic affect against tested *E. coli*, *S. aureus* and *B. licheniformis*. The strain *G. virens* 39 shown antibiotic activity against *A. tumefaciens* (inhibition zone is 18 mm).

The strains of *B. bassiana*, *C. globosum*, *F. culmorum*, *Fusarium sp.*, *Nectria sp.*, *N. oryzae*, *P. ucrainicum*, *S. brumptii*, *T. brevicompacium*, *Trichoderma sp.* and *U. atrum* did not display antibiotic activity.

### Discussion.

The finding shows that micromycete strains produce many bioactive compounds as secondary metabolites including antibiotics and toxins. The results obtained demonstrated that representatives of the genus *Aspergillus* and genus *Penicillium* are characterized by high antibiotic activity against phytopathogen bacteria and *B. licheniformis* 5. Only some strains of genus *Aspergillus* as *A. parvulus* 30, *A. terreus* 119, *A. versicolor* 56, *A. ustus* 103 and genus *Penicillium* as *P. aculeatum* 123, *P. brevicompactum* 144, *P. purpurogenum* 143 and *P. ochrochloron* 145 have antibiotic activity against *S. aureus* 904 and *E. coli* 906 or one of them.

Our experiments are consistent with previous results [6, 7]. Tsyganenko shown that *Aspergillus* strains demonstrated antibiotic activity especially *A. parvulus* 3142 [6, 7]. Some authors have also suggested that most of the *Aspergillus* strains displayed antimicrobial activity against methicillin-resistant *S. aureus*, extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* [8]. A large number of fungal extracts and/or

extracellular products have been found to have antimicrobial activity, mainly from the filamentous fungus *Penicillium sp.* [9,10]. The *Penicillium* species shown distinguished antimicrobial activities towards *Candida albicans*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Salmonella typhi* and *E. coli* [11]. Metabolites as penicillanone and penicillidic acids A-C from strain of

*P. aculeatum* PSU-RSPG105 showed moderate antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus* [12].

The extracts of cultural filtrates of *A. niveus* 2411 and *Penicillium sp.* 1051 have been shown the activity concerning phytopathogenic bacteria *A. tumefaciens* 8464. Note should be taken that the traditional methods of controlling of phytopathogenic bacteria such as metal-containing pesticides were not effective [13]. The fact of antibacterial activity of fungal culture filtrates against *A. tumefaciens* 8464 and *P. carotovorum* 8636 has been established previously [14]. Of great interest for the researches is the subsequent investigation of antibiotic activity of *Aspergillus* and *Penicillium* species as *A. alleaceus* 118, *A. pullulans* 43-46, *P. rubrum* 91 shown phytopathogenic activity against *P. carotovorum* 8636 and *A. versicolor* 56 against *E. coli* 906.

Another promising finding was that species of the genus *Aureobasidium* and *Paecilomyces* genus are characterized by antibacterial activity. Two strains such as *A. pullulans* 41, *P. variotii* 68 shown antibacterial effect against all test bacterial strains. It was reported in literature that strains of *A. pullulans* produce a wide range of substances such as antimicrobial chemicals, siderophores, enzymes, polysaccharides, polyesters and heavy oils [15]. In addition, an *A. pullulans* strain can produce antimicrobial compounds towards the Gram-negative *Pseudomonas fluorescens* and Gram-positive *S. au-*

*reus* bacteria [16]. The antibacterial activity of *A. pullulans* strains can be associated with 2-propylacrylic acid, 8,9-dihydroxy-2-methyl-4H,5H-pyrano [3,2-c]-chromon-4-one, 2-methylene-succinic acid and hexane- 1,2,3,5,6- hexol [17]. Equally important, some strains of *A. pullulans* are used in biological control of plant and storage diseases [18, 19]. In recent years there has been considerable interest in strains of *A. pullulans* as biopesticides. A proprietary mixture of two strains of *A. pullulans* was recently registered in the U.S. under the trade name “Blossom Protect” as a bio-control to prevent blossom infections by *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen Blossom Protect has been used successfully both Europe and in the Pacific Northwest. The new Botecior Fungicide contains yeast-like fungi, *A. pullulans* strains DSM 14940 and DSM 14941, as the active constituent [20].

The authors of more studies of secondary metabolites of *P. variotii* have exhibited that Gram-positive bacteria *Enterococcus faecalis* were inhibited by fungal extract [21]. Paeciloketals (1-3),

new benzannulated spiroketal derivatives, were isolated from the marine fungus *P. variotii* derived from the giant jellyfish *Nemopilema nomurai*. Compound 1 showed modest antibacterial activity against the marine pathogen *Vibrio ichthyoenteri* [22].

There have been several reports of antibiotic potential of *M. vinacea*. The cultural filtrates certain strains *M. vinacea* have been shown antibacterial activity against phytopathogenic bacteria *A. tumefaciens* and *P. carotovorum* [14]. The known compound from *M. vinacea* methyl 2,4-dihydroxy-3,5,6-trimethylbenzoate, mortivinacins A and nicotinic acid were responsible for the antibacterial activities of the extract [23].

The results obtained confirm that cultural filtrates of strains of *A. pullulans*, *P. variotii* and *M. vinacea* possess marked antibacterial activity. It must also be noted that it is very little data on antibiotic effect of strains of *A. pullulans*, *M. vinacea* and *P. variotii*. The evidence suggests that these strains are potentially important set of targets for farther investigation.

### 1. Antimicrobial activity of cultural liquid of micromycetes

No	n/n	Species	Strains	Diameter of inhibition zones of test, mm				
				Bacterium				
				Gram positive		Gram negative		
				S. aureus 904	B. licheniformis 5	E. coli 906	Agrobacterium tumefaciens 8464	Pectobacterium carotovorum 8636
1	2	3	4	5	6	7	8	
1		Altemaria alternata	116	0	0	0	16,0±0,7	11,0±0,9
2		Aspergillus alliaceus	118	0	0	0	0	15,0±1,0
3		A. parvulus	30	0	14,7±0,3	10,3±0,3	30,0±0,7	0
4			31	0	29,0±1,5	0	0	24,0±2,0
5		A. terreus	119	30±1,5	29,5±1,0	28,0±1,5	0	15,0±2,0

1. Antimicrobial activity of cultural liquid of micromycetes							
1	2	3	4	5	6	7	8
6	<i>A. versicolor</i>	56	0	0	25,0±1,5	0	0
7		58	0	23,0±1,0	0	0	0
8		59	0	14,0±0,6	0	0	0
9		60	0	17,3±0,4	0	13,0±1,0	0
10		61	0	14,3±0,4	0	0	19,0±3,0
11	<i>A. ustus</i>	101	0	15,2±0,4	0	0	13,0±1,0
12		102	0	12,0±1,0	0	0	15,0±2,0
13		103	15,0±0,7	16,0±0,7	19,8±0,4	0	15,0±1,0
14	<i>Aureobasidium pullulans</i>	41	10,0±0,7	15,0±0,7	11,7±0,9	30,0±0,8	25,0±1,0
15		43	0	0	0	0	15,7±0,4
16		44	0	0	0	0	10,8±0,4
17		45	0	0	0	0	20,0±0,7
18		46	0	0	0	0	20,0±0,7
19		150	0	25±2,0	0	0	0
20	<i>Botrytis</i> sp.	15	15,0±0,3	10,0±0,7	0	0	0
21	<i>Botrytis cinerea</i>	55	12,0±1,0	11,0±0,6	33,7±1,1	0	0
22	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	8	0	0	0	23,5±4,0	14,5±4,5
23		9	0	11,0±0,3	0	10,7±0,3	12,0±2,0
24		12	0	18,7±0,6	0	0	0
25	<i>Gliocladium virens</i>	39	0	0	0	18,0±1,0	0
26	<i>Curvularia inaequalis</i>	84	0	0	11,7±0,4	0	0
27	<i>Fusarium lactis</i>	130	0	18,3±0,3	0	0	0
28	<i>F. merismoides</i> f. <i>merismoides</i>	151	0	0	0	15,0±0,3	16,0±1,0
29	<i>F. solani</i>	128	0	14,0±1,0	0	0	0
30		129	0	0	19±0,7	0	0
31	<i>Mortierella vinacea</i>	62	0	0	20,0±0,7	0	22,0±1,0
32		63	12,0±1,0	14±1,0	0	0	24,0± 1.0
33		81	0	0	11,3±0,4	0	0
34		82	0	0	11,7±0,4	0	0
35	<i>Paecilomyces variotii</i>	67	0	0	0	12,7±0,1	10,0±1,0
36		68	14,3±0,6	17,6±0,4	12,0±2,0	30,0±1,0	20,0±0,7
37		69	11,0±0,7	0	0	0	10,7±0,8
38	<i>P. lilacinus</i>	127	0	24,0±1,5	20,0±1,0	0	0
39	<i>P. marquandii</i>	126	0	16,7±0,4	16,3±0,4	0	0
40		132	0	17,7±0,4	0	0	0
41	<i>Penicillium aculeatum</i>	121	0	20,3±0,4	0	0	0
42		123	12,0±0,7	19,0±1,0	0	12,0±0,7	14,0± 1,0

1. Antimicrobial activity of cultural liquid of micromycetes							
1	2	3	4	5	6	7	8
43		124	0	13,5±0,5	0	20,0±2,0	11,0±0,7
44	<i>P. brevicompactum</i>	144	12,7±0,4	14,0±1,0	10,7±0,4	13,0±2,0	17,0±2,0
45	<i>P. clavigerum</i>	112	0	11,0±0,7	0	0	0
46	<i>P. funiculosum</i>	1	0	12,7±0,4	0	15,0±2,0	12,0±0,7
47		2	0	0	0	32,0±1,0	9,0±0,3
48		3	0	24,0±1,0	0	18,0±0,7	19,3±0,7
49		4	0	18,3±0,7	0	16,7±0,4	16,3±0,4
50		5	0	14,0±0	0	16,3±0,4	15,3±0,4
51		6	0	20,3±0,4	0	17,0±0,7	17,7±1,1
52		7	0	12,0±2,0	0	0	11,0±0,7
53	<i>P. chrysogenum</i>	163	0	0	0	39,0±0,7	14,0±0,7
54	<i>P. ochrochloron</i>	145	11,7±0,4	19,0±1,0	0	12,0±0,7	13,7±0,1
55		156	0	14,3±0,4		20,0±0,7	11,0± 1,3
56	<i>P. purpurogenum</i>	143	0	21,0±0,5	16,7±0,4	12,0±1,3	11,7±0,4
57	<i>P. rubrum</i>	91	0	0	0	0	20,0±1,3
58	<i>Phialophora</i> sp.	135	0	22,0 ±2,0	13,3±0,4	0	0
59	<i>Pseudallescheria boydii</i>	131	0	17,3±0,6	12,5±0,5	0	0
60	<i>T. harzianum</i>	157	0	0	0	23,0±0,7	17,7±0,4
61	<i>T. viride</i>	120	12,0± 1,0	15,7±0,4	11,3±0,7	0	15,0±0,7
62	<i>Verticillium dahliae</i>	168	0	14,3±0,9	0	11,0± 0,7	19, 0±0,7
63	<i>U. consortiale</i>	106	0	8,7 ±0,4	0	0	15,0 ±1,0
64		107	0	14,3±0,4	0	0	15,0± 0,7

### References

- Mérillon, J.-M. & Ramawat, K.G. (Eds). (2017). *Fungal Metabolites*. Switzerland: Springer International Publishing.
- Rubezhniak, I.G. (2011) [Some features of secondary metabolism of microorganisms]. In: Akutina, S.P. (Eds). *Selected issues of modern science. Part 3. Monography* (pp. 283–310). In: Moscow: Pero. Russian.
- Tsyhanenko, K.S., Zaichenko, O. M. (2004). Antybiotychni vlastyvoli deiakykh vydiv rodu *Aspergillus* Mich. [Antibiotic properties of some species of genus *Aspergillus* Mich.] *Mikrobiol. Z.*, 66 (4), 56–61.
- Tsyhanenko, K. S. (2004). Otsinka antybiotychnoho potentsialu *Aspergillus parvulus* Smith. [Evolution of biotic potential of *Aspergillus parvulus* Smith.] *Naukovyi visnyk Chernivetskoho un-tu. Ser. Biolohiia.*, 194, 33–36.
- Bilay, V.I. (Eds). (1982). [Methods of experimental mycology]. Kiev: Naukova Dumka.
- Tsyhanenko, K.S. The evaluation of antibiotic and toxigenic potential of some species micromycetes of genera *Aspergillus* Mich. (2005). [author's abstract]. Danilo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv.
- Tsyhanenko, K.S., Zaichenko, O.M. (2004). Kharakterystyka fitotoksychnykh vlastyvostei *Aspergillus parvulus* Smith. [Characteristics of phytotoxic properties of *Aspergillus parvulus* Smith.] *Ahroekol. Z.*, 4, 42–45.
- Svahn, K. S., Goransson, U., El-Seedi, H., Bohlin, L., Larsson, D.G. J., Olsen, B., Chrysanthou, E. (2012). Antimicrobial activity of

- filamentous fungi isolated from highly antibiotic-contaminated river sediment. *Infection Ecology and Epidemiology*, 2, 1-6. DOI: 10.3402/iee.v2i0.11591
9. Rančić, A., Soković, M., Karioti, A., Vukojević, J., Skaltsa, H. (2006). Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity. *Environ. Toxicol. and Pharmacol.*, 22 (1), 80–84. DOI:10.1016/j.etap.2005.12.003
  10. Petita, K.E., Mondegueb, F., Roquebrct, M.F., Biarda, J.F., Pouchusa, Y.F. (2004). Detection of griseofulvin in a marine strain of *Penicillium waksmanii* by ion trap mass spectrometry. *J Microbiol. Methods*, 58, 59-65.
  11. Ciharaci-Fathahm, E., Tajick-Ghanbary, M.A., Shahrokhi, N. (2014). Antimicrobial properties of *Penicillium* species isolated from agricultural soils of Northern Iran. *Research Journal of Toxins*, 6 (1), 1–7.
  12. Daengrot, C., Rukachaisinkul, V., Tadpetch, K., Phongpaichit, S., Bowornwiriyan, K., Sakayaroj, J., Shend, X. (2016). Penicillanthone and penicillidic acids A - C from the soil-derived fungus *Penicillium aculeatum* PSU-RSPG105. *RSC Advances*, 6, 39530–40625.
  13. Savchuk, Ya.I., Zaichenko, O.M., Tsiganenko, K.S. (2013). Antibiotic activity of some fungi. *Mikrobiol. Z.*, 75 (5), 52– 61.
  14. Rubezhniak, I.G. Antibiotic and phytotoxic activities of cultural filtrates of some micromycete strains. (2018). *Mikrobiol. Z.*, 80 (5), 90 –97. DOI: <https://doi.org/10.15407/microbiolj80.05.090>
  15. Bozoudi, D., Tsaltas, D. (2018). The multiple and versatile roles of *Aureobasidium pullulans* in the vitivinicultural sector. *Fermentation*, 4 (85), 1–15. DOI:10.3390/fermentation4040085
  16. Zain, M.E., Awaad, A.S., Razak, A.A., Maitland, D.J., Khaims, N.E., Sakhawy, M.A. (2009). Secondary metabolites of *Aureobasidium pullulans* isolated from Egyptian soil and their biological activity. *J. Appl. Sci. Res.*, 5, 1582– 1591.
  17. McCormack, P.J., Wildman, H.G., Jeffries, P. (1994). Production of antibacterial compounds by phylloplane-inhabiting yeasts and yeast like fungi. *Appl Environ. Microbiol.*, 60, 927–931.
  18. Ferreira-Pinto, M.M., Moura-Guedes, M.C., Barreiro, M.G., Pais, I., Santos, M.R., Silva, M.J. (2006). *Aureobasidium pullulans* a bio-control agent of blue mold in “Rocha” pear”. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 71(3 Pt B), 973–978.
  19. Zhang, D., Spadaro, D., Valente, S., Garibaldi, A., Gullino, M.L. (2012). Cloning, characterization, expression and antifungal activity of an alkaline serine protease of *Aureobasidium pullulans* PL5 involved in the biological control of postharvest pathogens. *Int. J. of Food Microbiology*, 153 (3), 453–464. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.016
  20. Australian pesticides and veterinary medicines authority. (2017). Public release summary on the evaluation of the new active *Aureobasidium pullulans* (strains DSM 14940 and DSM 14941) in the product Botector Fungicide. Retrieved from URL: [https://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/27401-82495\\_105881\\_-\\_botector\\_fungicide\\_-\\_prs\\_0.docx](https://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/27401-82495_105881_-_botector_fungicide_-_prs_0.docx)
  21. Oliveira, S.M., Sena, K.X., Gusmio, N.B. (2009). Secondary metabolites produced by endophytic fungus *Paecilomyces variotii* Bainier with antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. In: *Proceedings of the II International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2007)*, 2007 Nov 28 - Dec 1; University of Seville, Spain. Formatec Research Center, Spain, 519 – 22.
  22. Wang, H., Hong, J., Yin, J., Moon, H.R., Liu, Y., Wei, X., Oh, D.C., Jung, J.H. (2015). Dimeric octaketide spiroketals from the jellyfish-derived fungus *Paecilomyces variotii* J08NF-1. *J. Nat. Prod.*, 78 (11), 2832–2836.
  23. Soman, A.G., Gloer, J.B., Wicklow, D.T. (1999). Antifungal and Antibacterial Metabolites from a *Sclerotium*-Colonizing Isolate of *Mortierella vinacea*. *J. Nat. Prod.*, 62 (2), 386–388.

**І. Г. Рубежняк (2020). АНТИБАКТЕРІАЛЬНА АКТИВНІСТЬ КУЛЬТУРАЛЬНИХ ФІЛЬТРАТИВ ШТАМІВ МІКРОМІЦЕТІВ. BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 11(1): 42-49. <http://journals.nubip.edu.ua/>. <https://doi.org/10.31548/biologiya2020.01.042>.**

**Анотація.** Метою роботи був скринінг серед 125 штамів мікроміцетів, виділених із різних екологічних ніш, на антибактеріальну активність. Активність вивчалася з використанням різних тест-організмів – грамнегативних та грампозитивних бактерій. Показано, що тільки 64 досліджуваних штамів проявили антибактеріальну активність. Широким спектром антибіотичної дії характеризувалися досліджувані штами роду *Aspergillus* та *Penicillium*. Штами роду *Aureobasidium* та *Paecilomyces*, такі як *A. pullulans* 41, *P. variotii* 68, також проявили антибактеріальний ефект на досліджувані бактерії. Встановлено, що штами *M. vinacea* проявляють антибактеріальний ефект на *Staphylococcus aureus* 904 та *E. coli* 906. Більшість штамів не показали антибактеріальної дії. Найбільш перспективними для подальших досліджень є штами *A. pullulans*, *P. variotii* та *M. vinacea*, які проявляють високу антибактеріальну активність та мало досліджені.

**Ключові слова:** мікроміцети, антибактеріальна активність, грамнегативні та грампозитивні бактерії.

---

## ВПЛИВ КСЕНОБІОТИКІВ НА ЯКІСНИЙ СКЛАД ПРОКАРІОТ ВОДНОЇ ЕКОСИСТЕМИ ЧОРНОГО МОРЯ

---

**М.О. ПАВЛОВСЬКА**, аспірантка,  
Національний університет біоресурсів  
і природокористування України, науковий співробітник, Державна  
Установа Національний антарктичний науковий центр МОН України  
E-mail: [mawwwa88@gmail.com](mailto:mawwwa88@gmail.com)

**Л. І. СОЛОМЕНКО**, кандидат біологічних наук, доцент кафедри  
загальної екології та безпеки життєдіяльності,  
Національний університет біоресурсів і природокористування  
E-mail: [sollud@nubip.edu.ua](mailto:sollud@nubip.edu.ua)

**Є. П. ПРЕКРАСНА**, кандидат біологічних наук, старший науковий  
співробітник,  
Державна Установа Національний антарктичний науковий центр МОН  
України  
E-mail: [preckrasna@gmail.com](mailto:preckrasna@gmail.com)

**Є. О. ДИКИЙ**, кандидат біологічних наук, директор,  
Державна Установа Національний антарктичний науковий центр МОН  
E-mail: [evgen.dykyi@gmail.com](mailto:evgen.dykyi@gmail.com)

**Анотація.** Процеси біотрансформації та біоремедіації, ключову роль у яких відіграють угруповання мікроорганізмів, виконують значну роль у вилученні токсичних речовин із трофічних ланцюгів екосистеми. Роль мікроорганізмів у розкладі ксенобіотиків є особливо важливою у водних екосистемах напівзакритого типу зі значним річковим стоком – таких, як Чорне море. Згідно з даними проекту ПРООН ЕМБЛАС у водах Чорного моря було відмічено наявність низки поліароматичних вуглеводнів та хлорорганічних сполук, концентрація яких перевищувала гранично допустимі норми. Саме тому для дослідження функціональної відповіді екосистеми Чорного моря на вплив забруднюючих речовин, ми провели молекулярно-генетичну оцінку таксономічного біорізноманіття мікробних угруповань для виявлення таксонів, потенційно здатних до біотрансформації ксенобіотиків. Дослідні зразки морської води та донних осадових відкладів було відібрано в серпні-вересні 2017 року в рамках дослідницького рейсу (Joint Open Sea Survey) проекту EMBLAS-II. Подальший аналіз включав екстракцію ДНК зі зразків та проведення секвенування на платформі Ion Proton для визначення таксономічного біорізноманіття мікробних угруповань. Нами була показана наявність бактерій, що належать до таксономічних груп із попередньо експериментально визначеною здатністю до біотрансформації ксенобіотиків у водній товщі та донних осадах Чорного моря. Так, представники таких таксонів,

як *Rhodobacteraceae*, *Rhodospirillaceae*, *Halomonadaceae*, *Oceanospirillaceae*, *Alcanivoracaceae*, *Bacilliaceae*: *Actinomycetales* та *Acidobacteriaceae* були присутні в угрупованнях бактеріопланктону на всіх станціях дослідницького полігону. В угрупованнях донних осади значну частку становили представники *Alteromonadales* та *Piscirickettsiaceae*, здатні до розкладу поліароматичних вуглеводнів, а також *Desulfuromonadaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Syntrophaceae*, *Peptococcaceae*, *Dehalococcoideaceae*, для яких раніше була показана здатність до біотрансформації хлорорганічних сполук.

Отримані результати є базовою інформацією, яка ляже в основу подальшого детального аналізу функціонального потенціалу мікробних угруповань щодо розкладу забруднюючих речовин, що має на меті ідентифікацію нових метаболічних шляхів біотрансформації ксенобіотиків та дослідження адаптаційних стратегій екосистеми до антропогенних змін навколишнього середовища.

**Ключові слова:** біотрансформація, ксенобіотики, самовідновлення водної екосистеми, угруповання мікроорганізмів, Чорне море

### **Актуальність та огляд попередніх досліджень.**

Необхідність знайти оптимальні шляхи біоремедіації навколишнього середовища призвела до значного зростання наукового інтересу до проблеми розкладу ксенобіотиків мікробними угрупованнями в останні десятиліття [1]. Процеси біоремедіації та біотрансформації передбачають природну здатність мікроорганізмів до розкладу, трансформації та накопичення широкого спектра органічних забруднюючих речовин, які виявляють ксенобіотичні властивості. Ці процеси виконують значну роль у вилученні ксенобіотиків із трофічних ланцюгів екосистеми та її самовідновленні.

Продукти метаболічних перетворень ксенобіотиків мікроорганізмами часто стають менш токсичними, ніж вихідні сполуки [2, 3, 4, 5, 6, 7]. Крім того, мікробне розщеплення довголанцюгових полімерних сполук на олігота мономери робить їх доступними для засвоєння іншими організмами.

Роль угруповань мікроорганізмів у метаболізмі забруднюючих речовин є особливо важливим компонентом функціонування морських екосистем напівзакритого типу, якою є Чорне море [8]. Чорне море характеризується значним надходженням ксенобіотиків, зокрема, через масштабний річковий стік Дніпра, Дністра та Дунаю. Згідно з даними, отриманими в рамках проекту ПРООН ЕМБЛАС у 2016 та 2017 роках у водах Чорного моря присутня низка поліароматичних вуглеводнів, а концентрація хлорорганічних сполук (таких, як гексахлоргексан) перевищує максимально допустимі норми на більшості станцій моніторингу акваторії [9]. Також була відмічена наявність пестицидів та продуктів фармацевтичної індустрії у водному середовищі. Саме тому для оцінки відповіді екосистеми на постійне надходження забруднюючих речовин важливо провести аналіз таксономічного та функціонального складу мікробних угруповань Чорного моря з погляду їхньої

потенційної ролі в розкладі ксенобіотиків. Таке дослідження дасть змогу отримати базову інформацію для подальшого моніторингу стану акваторії Чорного моря згідно з вимогами Морської Рамкової Директиви ЄС (MSFD). Дані моніторингу процесів мікробної трансформації ксенобіотиків можуть використовуватися для оцінки таких дескрипторів Директиви, як 1. Біорізноманіття, 4. Харчові ланцюги та мережі, 8. Забруднюючі речовини [10].

Участь мікроорганізмів у деструкції органічних забруднюючих речовин, що проявляють ксенобіотичні властивості, досліджувалася неодноразово, проте переважно на представниках тих мікробних таксонів, які ростуть у культуральних умовах – *Pseudomonas* spp. та *Rhodococcus* spp [11, 12, 13]. Ці бактерії можуть використовувати органічні забруднюючі речовини, як джерело вуглецю, або розкласти ксенобіотики без використання їх, як субстрату для росту, активуючи специфічні ферменти – ди- та монооксигенази або дигідрохлорінази [3, 11].

Однак, мікроорганізми здатні до розкладу ксенобіотиків, можуть бути представлені як культивованими, так і не культивованими формами [14]. Оскільки більша частина мікробного різноманіття не може бути досліджена в умовах культури (~95%), є необхідність використання молекулярно-генетичних методів для оцінки потенціалу мікробних угруповань до розкладу ксенобіотиків. Саме тому ми провели молекулярно-генетичну оцінку таксономічного біорізноманіття мікробних угруповань Чорного моря для виявлення таксонів, потенційно здатних до біотрансформації ксенобіотиків.

## Матеріали та методи досліджень.

У серпні-вересні 2017 року протягом дослідницького рейсу (Joint Open Sea Survey-JOSS) у рамках проекту EMBLAS-II було відібрано 9 зразків морської води на 3 станціях (5, 8 та 9), а також 5 зразків донних осадів на станціях 1, 1A, 1B, 4, 8) (рис.1). Зразки морської води відбирали на таких горизонтах: поверхня, глибинний максимум хлорофілу та мінімум кисню. Відповідні глибини визначали за даними СТД зонда. Мінімум кисню було встановлено на глибинах із концентрацією  $O_2$ , що не перевищувала 2 мг/л. Для відбору мікробної біомаси з кожного горизонту було пропущено по 2 л води через стерильні фільтри Millipore Sterivex-GP із діаметром пор 0,22 мкм за допомогою системи перистальтичної фільтрації Masterflex. Для запобігання деградації нуклеїнових кислот фільтри заморожували за температури  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  одразу по завершенню фільтрації.

Зразки донних осадів відбирали за допомогою мультикорера в трубки з оргскла. По 5 мл донних осадів було відібрано в стерильні пластикові шприци з поверхневого шару й заморожено за температури  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Геномну ДНК було екстраговано за допомогою MO BIO PowerSoil® DNA Isolation Kit (QIAGEN) із використанням стандартних протоколів виробника. Концентрацію та якість ДНК визначали на спектрофотометрі NanoDrop Spectrophotometer та флуориметрі Quibit 2.0 Fluorometer (Thermo Fischer Scientific). В усіх зразках було встановлено концентрацію ДНК, яка була достатня для подальшого молекулярно-генетичного аналізу (від 4.7 нг/мкл to 95 нг/мкл, здебільшого  $>10$  нг/мкл), співвідношення 260/280 - 1.8.



**Рис. 1.** Розташування станцій моніторингу дослідницького рейсу JOSS

Секвенування зразків проводили в Університеті Нанькін (Nanjing University, China) на платформі Ion Proton sequencer (Life Technologies, U.S.A.). Для визначення таксономічного складу мікробного угруповання використовували універсальну для прокариот пару праймерів 341f/518r (F: ACCTACGGGRSGCWGCAG та R: GGTDTTACCGCGGCKGCTG), що ампліфікують V3 ділянку 16S довжиною 180 пн [15]. Згідно з методикою до 5'-кінця кожного з праймерів було додано унікальний фрагмент-баркод довжиною 12 пн (Shanghai Generay Biotech Co., Ltd). Кожну ПЛР реакцію було проведено в трьох повторностях в об'ємі 30 мкл із використанням трьох негативних ПЛР-контролів, у якості яких застосовували воду, очищену від нуклеїнових кислот та нуклеаз. Нижче представлені складові компоненти (табл. 1) та термічні умови реакції (табл. 2).

Продукти ПЛР перевіряли на 2 % агар-гелі й очищали з використанням набору E-Z 96 Cycle Pure Kit (Omega, U.S.A.). На наступному етапі було

визначено кількість ПЛР продуктів для їхнього подальшого об'єднання в однакових концентраціях для секвенування. До очищених ПЛР фрагментів було приєднано адаптори за допомогою набору реагентів Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.), після чого всі зразки розчинили до концентрації 100 пМ і провели секвенування на платформі Ion Proton.

*Біоінформатичний та статистичний аналіз* було проведено за допомогою програмного забезпечення на сервері ION server (версія 3.6.2). Програмне забезпечення QIIME2 [16], використовували для фільтрації даних та виявлення послідовностей низької якості: гомополімерів, коротких послідовностей <150 пн, помилок спарювання праймерів.

Операційні таксономічні одиниці (ОТО) було об'єднано в кластери з використанням плагіну DADA2 програми QIIME2. Таксономічне підпорядкування ОТО було визначено за базами даних Greengenes [17] та SILVA [18].

## 1. Складові компоненти ПЛР реакції для отримання 16S ампліконів

Складова	Об'єм, мкл
ddH <sub>2</sub> O	19.1
Буферний розчин 5×Phusion Green HF Buffer	6
10 мМ дНТФ	0.6
Праймер F	1
Праймер R	1
Полімераза Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase	0.3
ДНК зразок	2

## 2. Термічні умови ПЛР реакції

Етап	Температура, °C	Час, сек.	
Початкова денатурація	98	30	
Денатурація	98	5	30 циклів
Відпал	55	30	
Елонгація	72	15	
Фінальна елонгація	72	420	

Зразки, де не було виявлено валідних послідовностей, були вилучені з подальшого аналізу.

Аналіз вмісту органічних забруднюючих речовин та пестицидів було проведено Лабораторією аналітичної хімії Національного Університету Афін в рамках проекту EMBLAS-II.

### Результати досліджень та їх обговорення.

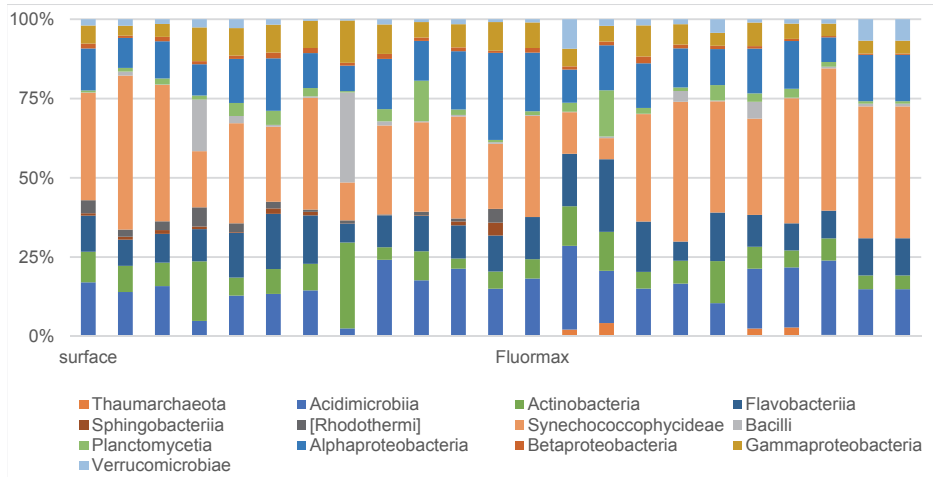
Як бачимо (рис. 2), найпоширенішими класами мікробного угруповання поверхневого шару та глибинного максимум хлорофілу є: *Synechocophycideae* (6,1–46,4%), *Flavobacteria* (5,8–20,9%), *Actinobacteria* (3,0–26,2%), *α-proteobacteria* (7,6–25,2%), *γ-proteobacteria* (3,0–12,9%), *Bacilli* (0,1–27,5%), *Acidimicrobia* (2,4–25,1%).

У меншій кількості представлені *Verrucomicrobiae* (0,4–8,8%),

*β-proteobacteria* (0,4–2,0%), *Plancomycetia* (0,4–13,3%), які було виявлено в усіх проаналізованих зразках. Представників *Sphingobacteria* (0,03–3,7%) та *Rhodotermiti* (0,2–5,8%) було виявлено у більшості зразків з поверхні, в той час, як археї класу *Thaumarchaeota* (0,2–3,8%) були представлені винятково в глибинному максимумі хлорофілу.

Співвідношення родин, виявлених у класах *Flavobacteria*, *Actinobacteria*, *α-proteobacteria*, *γ-proteobacteria* та *Acidimicrobia* представлено в таблиці 3.

Угруповання прокаріот донних осадів характеризувалося більшим таксономічним різноманіттям, однак домінували лише кілька таксонів. Клас *d-proteobacteria* (13,3–20,1%), що включає більшість відомих сульфат-редуючих бактерій (*Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus* та ін.),



**Рис. 2. Вертикальний розподіл класів прокаріот у водному середовищі Чорного моря**

**3. Відносна поширеність родин прокаріот у межах виявлених класів у водній товщі Чорного моря**

Клас	Родина	Відносна поширеність, %	Стандартне відхилення
Actinobacteria	Microbacteriaceae	1.8	0.4
	Micrococcaceae	0.5	0.4
	Unassigned	5.1	1.7
Acidimicrobia	OCS155	11.1	1.2
	C111	2.4	0.01
	ZA3409c	0.3	0.1
	SC3-41	0.40	0.2
Flavobacteria	Flavobacteriaceae	8.2	1.1
	Cryomorphaceae	0.8	0.4
	NS9	0.8	0.5
	Cryomorphaceae	0.3	0.1
α-proteobacteria	Pelagibacteraceae	7.6	1.4
	Rhodobacteraceae	2.9	0.2
	Rhodospirillaceae	0.4	0.2
	Unassigned	2.9	0.1
	Halomonadaceae	3.1	0.6
γ-proteobacteria	OM60	0.3	0.1
	HTCC2089	0.3	0.1
	Piscirickettsiaceae	0.3	0.1
	Unassigned	1.5	0.3

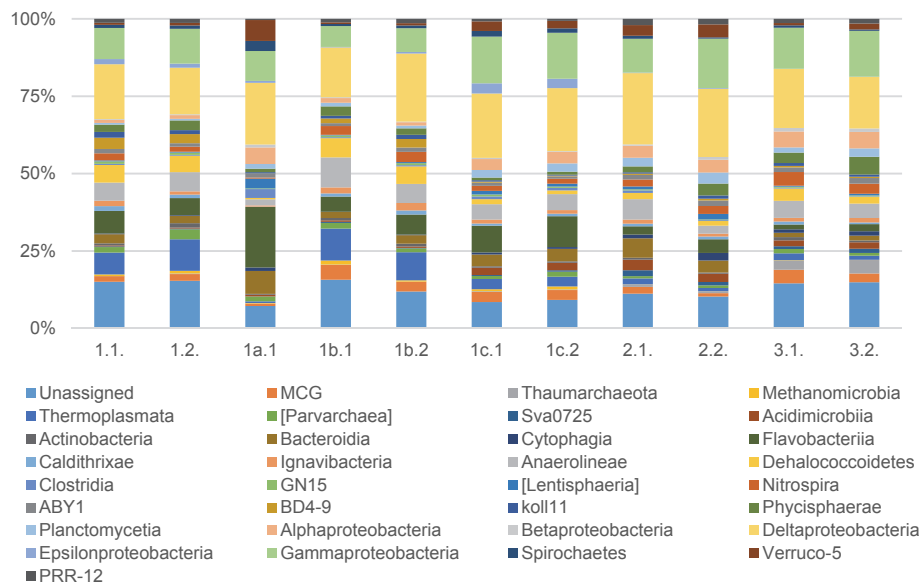


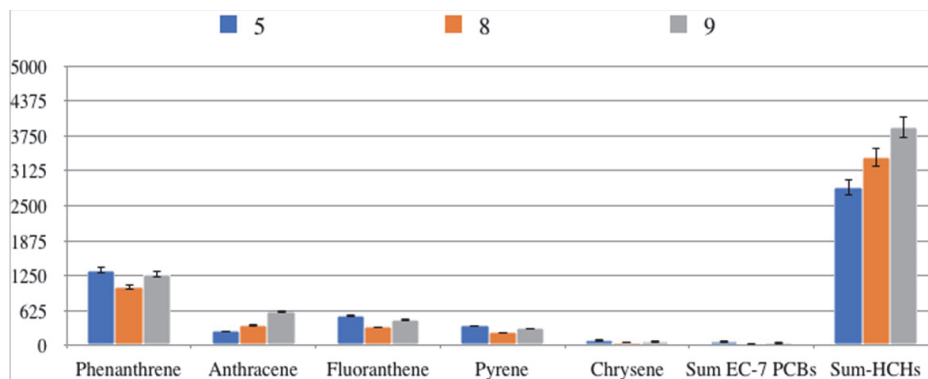
Рис. 3. Відносна поширеність класів прокариот у донних осадах

а також анаеробів із різною фізіологією (наприклад, рід *Geobacter*, здатний до відновлення заліза), були найпоширенішими в донних осадах Чорного моря. Наступними за відносною поширеністю були *g-proteobacteria* (6,0–13,6%), *Flavobacteriia* (1,3–15,9%), *Thermoplasmata* (0,4–9,2%), *Anaerolineae* (1,6–8,7%), *Dehalococcoidetes* (0,3–5,6%). Крім зазначених було встановлено наявність представників 24-х класів прокариот. *Bacteroidia*, *Nitrospira*, *Phycisphaerae*, *Alphaproteobacteria*, *Spirochaetes* та *Verruco-5* були присутні в усіх досліджених зразках донних осадів і становили до 5% кожен. Представники інших класів (рис. 3) були менш чисельні і складали до 3%.

Відомо, що здатність до розкладу органічних забруднюючих речовин, таких як поліароматичні вуглеводні, була описана для *Pseudomonas spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Micrococcus spp.* [5, 11, 12, 13]. Переважна більшість

досліджень зосереджена на представниках цих таксонів, оскільки вони добре вивчені в культурі, а тому порівняно легко піддаються виділенню з різних середовищ. Однак, здатність до біотрансформації органічних ксенобіотиків властива більш широкому спектру мікроорганізмів.

Активність морських мікробних угруповань у метаболізмі забруднюючих речовин є пріоритетним напрямком досліджень, оскільки морське середовище зазнає значної шкоди через антропогенне забруднення під час розливу нафтопродуктів. Так, у прибережних морських водах було виявлено різноманіття бактерій, зданих до розкладу поліароматичних вуглеводнів (ПАВ) [19, 20, 21]. Вважається, що бактерії роду *Cycloclasticus* (родина *Piscirickettsiaceae*,  $\gamma$ -*proteobacteria*) є найпоширенішими деструкторами ПАВ (нафталену, антрацену, фенантрени, пірену та флуорену) серед мікроорганізмів, що населяють морське



**Рис. 4. Концентрація забруднюючих речовин у водній товщі Чорного моря (нг/л)**

середовище (водну товщу та донні осади) (Cui et al., 2008; Wang et al., 2008). Більшість бактерій, яким властива здатність до біотрансформації ПАВ належать до класів *α-proteobacteria*, *γ-proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroides*, *Acidobacteria* та *Bacillus*. Саме представники цих класів і були визначені нами в найбільшій кількості у водній товщі та донних осадах Чорного моря (рис. 2 та 3). В угрупованні мікроорганізмів водної товщі переважали представники *Actinobacteria*, *Acidimicrobia* та *α-proteobacteria*, а в донних осадах домінували *γ-proteobacteria* та *Bacterioides*.

За даними проєкту EMBLAS-II безпосередньо в зразках морської води, у яких ми проаналізували якісний склад мікробних угруповань, виявили високі концентрації ПАВ (фенантрєну, флуорантрєну, антрацену, прїрену), а також пестицидів (гексахлоргексану) (рис. 4).

Крім того, за даними хїмічного аналізу донних осадів, було визначено, що станції, розташовані в межах українського шельфу (станції 1А, 1В, 1 – рис. 3) характеризуються найвищими концентраціями пестицидів (44 нг/л для станції 1А).

### Висновки та перспективи.

Отже, дані хїмічного та метагеномного аналізу підкреслюють перспективи подальших досліджень біотрансформації ксенобіотиків мікробними угрупованнями Чорного моря, що надзвичайно важливо в екологічних дослідженнях самовідновлення водної екосистеми.

Отримані нами результати можуть бути базовою інформацією, яку планується використовувати для подальшого детального аналізу функціонального потенціалу мікробних угруповань щодо розкладу забруднюючих речовин. Це, своєю чергою, має на меті ідентифікацію нових метаболічних шляхів біотрансформації ксенобіотиків та дослідження адаптаційних стратегій екосистеми до антропогенних змін навколишнього середовища.

### References

1. Singh, Sh. Nath. (2012). Microbial Degradation of Xenobiotics. [Environmental Science and Engineering]. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 486.
2. Fetzner S. (2002). Biodegradation of xenobiotics. In Doelle H W, Rokem S, Berovic M (eds.)

- Biotechnology. Volume 10. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). EOLSS Publishers Co. Ltd., Oxford. pp. 215–246
3. Muangchinda, C., Pansri, R., Wongwongsee, W. and Pinyakong, O. (2013), Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation potential in mangrove sediment from Don Hoi Lot, Samut Songkram Province, Thailand. *J Appl Microbiol*, 114, 1311-1324. doi:10.1111/jam.12128
  4. Louvado, A., Gomes, N.C.M., Simões, M.M.Q., Almeida, A., Cleary, D.F.R., Cunha, A. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons in deep sea sediments: Microbe–pollutant interactions in a remote environment. *Science of the Total Environment*, 526, 312–328
  5. Isaac, P., Lozada, M., Dionisi, H.M., Estevez, M.C., Ferrero, M.A. (2015). Differential expression of the catabolic nahAc gene and its effect on PAH degradation in *Pseudomonas* strains isolated from contaminated Patagonian coasts *International. Biodeterioration & Biodegradation*, 105, 1-6
  6. Liu, Q, Tang, J, Bai, Z, Hecker, M, Giesy, J.P. (2015). Distribution of petroleum degrading genes and factor analysis of petroleum contaminated soil from the Dagang Oilfield, China. *Scientific Reports*, 5, 11068 doi: 10.1038/srep11068
  7. Duran, R., Cravo-Laureau, C. (2016). Role of environmental factors and microorganisms in determining the fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in the marine environment. *FEMS Microbiology Reviews*, fuw031
  8. Vetriani, C., Tran, H.V., Kerkhof, L.J. (2003). Fingerprinting microbial assemblages from the oxic/anoxic chemocline of the Black Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 6481–6488
  9. Slobodnik, J., Alexandrov, B., Komorin, V. (2017). National Pilot Monitoring Studies and Joint Open Sea Surveys in Georgia, Russian Federation and Ukraine. Final Scientific Report
  10. Barnes, R., Metcalf, D. (2010). Current Legal Developments – The European Union: The Marine Strategy Framework Directive. *International Journal of Marine and Coastal Law*, 25, 81-91
  11. Habe, H., Omori, T. (2003). Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 67(2), 225–243
  12. Nwinyi, O.C., Ajayi, O.O., Amund, O. O. (2016). Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by two strains of *Pseudomonas*. *Braz J Microbiol.*, 47(3), 551–562
  13. Ma, J., Xu, L., Jia, L. (2012). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. JM2 isolated from active sewage sludge of chemical plant. *J Environ Sci (China)*, 24(12), 2141-8
  14. Kim, A.V., Buzoleva, L.S., Bogatyrenko, E.A., Zemskaya, T.I., Mamaeva, E.V. (2018). Monitoring of oil hydrocarbons pollution in the Sea of Japan, based on detection of marker genes in microbial communities. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 107, 012061
  15. Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T. et al. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Resources*, doi: 10.1093/nar/gks808
  16. Caporaso, J.G., Bittinger, K., Bushman, F.D. et al. (2010). PyNASt: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics*, 26, 266–7
  17. DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., et al. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 5069– 5072
  18. Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J, et al. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.*, 35, 7188– 7196
  19. Head, I.M., Jones, D.M., Roling, W.F.M. (2006). Marine microorganisms make a meal

- of oil. - Nat. Rev. Microbiol., 4, 173–182. doi: 10.1038/nrmicro1348
20. Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Golyshin, P.N. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. - Curr. Opin. Biotechnol., 18, 257–266. doi: 10.1016/j.copbio.2007.04.006
21. Lamendella, R., Strutt, S., Borglin, S., Chakraborty, R., Tas, N., Mason, O.U. et al. (2014). Assessment of the Deepwater Horizon oil spill impact on Gulf coast microbial communities. - Front. Microbiol., 5, 130. doi: 10.3389/fmicb.2014.00130

**M. Pavlovska, L. Solomenko, I.E. Prekrasna, E. (2020). Dykyi XENOBIOTICS' IMPACT ON BLACK SEA PROKARYOTIC COMMUNITIES' QUALITATIVE COMPOSITION.**

*BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION*, 11(1): 50-59. <http://journals.nubip.edu.ua/>.

<https://doi.org/10.31548/biologiya2020.01.050>.

**Abstract.** Biotransformation and bioremediation mediated by microbial communities is known to determine the fate of pollutants in the ecosystems and their effect on other biota preventing from xenobiotics accumulation in the food web. These processes are even more important in semi-closed marine ecosystems, which receive plenty of river run-off, such as the Black Sea. An ubiquity of polyaromatic hydrocarbons and organochlorine compounds, are present in the Black Sea water in concentrations, which exceeded maximum permissible, according to the results of the Joint Black Sea Surveys 2016 conducted in the course of UNDP EMBLAS project. In addition, the presence of pesticides, herbicides and pharmaceutical products was detected at the majority of monitoring stations. Therefore, it is expedient to assess microbial communities' taxonomic and functional diversity with the emphasis on xenobiotics' biotransformation potential, in order to analyze the Black Sea ecosystem functional response towards constant pollution inflow. Such research has the potential to contribute to the estimation of Marine Framework Strategy Directive indicators and to Black Sea ecological status assessment. Black Sea microbial taxonomic diversity was assessed in seawater and sediments samples collected during Joint Open Sea Survey conducted in the course of UNDP EMBLAS-II project. Genomic DNA was extracted from the samples and 16S V3 was sequenced at Ion Proton platform. Consequently, prokaryotic taxonomic diversity was determined with QIIME-II pipeline using Green Genes and SILVA databases. Our data indicates the presence of a number of taxonomic groups, known to be responsible for organic pollutants' degradation. Such taxa, as Rhodobacteraceae, Rhodospirillaceae, Halomonadaceae Oceanospirillaceae, Alcanivoracaceae, Bacillaceae, Actinomycetales and Acidobacteriaceae were detected in Black Sea water at the majority of the stations. Sediments samples were characterized by overall higher bacterial diversity and harbored Alteromonadales and Piscirickettsiaceae, which have experimentally proven polyaromatic hydrocarbon degradation capability. Besides, Desulfuromonadaceae, Desulfobacteraceae, Syntrophaceae, Peptococcaceae and Dehalococcoideaceae, previously shown to act in organochlorine compounds biotransformation, comprised a significant portion of sediments microbial community. The results obtained are the baseline for subsequent detailed studies of Black Sea microbial communities functional biodegradation potential. This, in turn, sets the background for the research of ecosystem adaptation strategies to anthropogenic xenobiotic pollution and to the identification of novel metabolic pathways involved in this process.

**Keywords:** biotransformation, xenobiotics, ecosystem bioremediation, microbial communities, Black Sea

## PHYTOTOXIC PROPERTIES OF CULTURE FILTRATES OF MICROMYCETE *SCLEROTINIA SCLEROTIURUM* (LIB.) DE BARY ISOLATES FROM THE PHYLLOSHERE OF VARIOUS HOST PLANTS

**M.Y. PIKOVSKIY**, PhD in Biology, docent of the Department of Phytopathology named after Academician V.F. Peresyphkin

**M.M. KYRYK**, Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Phytopathology named after Academician V.F. Peresyphkin

**V.V. BORODAI**, Doctor of Agricultural Sciences, Associate Professor, Department of Ecobiotechnology and Biodiversity National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine  
E-mail: mprmir@ukr.net

**Abstract.** Phytotoxicity of isolates in *S. sclerotiorum* populations extracted from different geographic conditions and host plants has been established. The results of studies of the influence of culture filtrates of 42 isolates of the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary of different geographical origin on the germination of seeds and growth of seedlings of winter wheat plants are presented. All the isolates tested showed a phytotoxic effect, which consisted of reduced seed germination, inhibition of root system growth and seedlings. *S. sclerotiorum* isolates extracted from soybean and rapeseed plants (Kyiv region, Vasylkiv district) showed the most negative impact on seed germination rates. Their phytotoxic effect caused a decrease in seed germination by 12.4-13.4 % less than in the control. *S. sclerotiorum* isolates also induced a reduction in the root length of the plant and inhibition of seedling growth compared to a control average of 1.0 to 57.9%. In particular, 71-100% of fungus isolates extracted from soybean and rapeseed plants (Kyiv region, Vasylkiv district) had a high degree of toxicity.

**Key words:** phytotoxicity, culture filtrate, isolates, population, *Sclerotinia sclerotiorum*, growth rates

## Introduction.

The necrotroph fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary is a cosmopolitan with a wide trophic specialization and is able to parasitize over 400 species of plants from different botanical families (Boland, G. J., Hall R., 1994), causing white mold. In Ukraine, it infects a variety of crops (Kyryk, M.M., Pikovskyi, M.Y., Azaiki, S., 2012), reducing yields and degrading its quality (Kirik, N.N., Koltunov, V.A. Brodai, V.V., 2001; Pikovskyi, M., Kyryk, M., Arnauta, N., 2018). *S. sclerotiorum*, as a causative agent of white mold of plants, has a wide range, occupies various ecological niches and is environmentally plastic. The study of its toxicogenic properties is relevant because of the great importance of this pathogen in various agroecosystems as a dangerous phytotroph. Significant plant damage, lack of high resistance to varieties and hybrids and high susceptibility to white mold caused by *S. sclerotiorum* require constant studies of various aspects of this pathogen (Bolton, M. D., Thomma, B. P. H. J., Nelson, B. D., 2006), including its phytotoxic effects (Sharma, P. C., Meena, P. D., Singh, Dhiraj, 2014).

## Analysis of recent research and publications.

Phytotoxins are secondary metabolites, produced by individual pathogens, and have an important role in the interaction of pathogens with plants and the occurrence of the disease (Svabova, L., Lebeda, A., 2005). In the studies of Parveen, Shazia et al. (2019), germination of *Solanum lycopersicum* seeds was completely inhibited by the culture filtrate of the fungi *Trichothecium rose-*

*um* and *Alternaria alternata*. *Penicillium expansum* culture filtrate caused of the complete suppression of *Brassica rapa* seed germination. The authors also found that the filtrate of *Fusarium solani* culture at a low concentration increases the percentage of sprouted seeds (Parveen, Shazia & Wani, Ab. Hamid & Bhat, Mohd., 2019). Seed germination and subsequent growth of *Cuminum cyminum* seedlings slows down the *Fusarium equiseti* culture filtrate even at low concentrations (Suthar, Ramchandra & Bhatt, Daksha & Bhatt, Prashant, 2014). Some researchers noted inhibitory and stimulating effects of culture filtrates of *Penicillium* spp. on the germination of wheat seeds depending on the type of fungus (Ibatsam Khokhar et al., 2013). Corn seeds, treated with *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum* cultivated filtrates, reduced the germination rates to 65.33 % and 79.67 % respectively, whereas in the control, this indicator was 100 % (Garuba, T. et al., 2015). In studies by Sharma P. et al (2014), culture filtrates of 25 isolates of *S. sclerotiorum*, isolated from *Brassica juncea* cv. Rohini, reduced the germination of seeds at the varying degrees.

Thus, the analysis of scientific publications shows the different influence of the culture filters of phytopathogenic fungi on the germination of seeds, which is related to the species and strain differences of microorganisms (Suthar, Ramchandra & Bhatt, Daksha & Bhatt, Prashant, 2014; Parveen, Shazia & Wani, Ab Hamid & Bhat, Mohd, 2019). At the same time, information on the phytotoxicity studies of *S. sclerotiorum* has not been reported in Ukraine over the last decades, and these issues have not been studied.

**The purpose of the study** was to determine the spectrum of phytotoxic activity of the culture filtrate of *S. sclerotiorum*

isolates from different host plants and to analyze their effect on winter wheat germination, root system growth and seedlings.

### **Materials and methods.**

42 isolates of the fungus *S. sclerotiorum* were the objects of the study (Table 1). They have been removed from different geographical regions from the soybean, rapeseed, sunflower and dahlias. They were stored in a working collection of pure cultures of the Department of Phytopathology named after Academician V.F. Peresyphkin of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine (NULES of Ukraine).

The 5 mm diameter agar discs were cut out by a cork drill from the edge of a 7-day actively growing *S. sclerotiorum* colony. One mycelial disc was placed in a 250 ml conical flask with 100 ml of Richard's sterile liquid medium and incubated at 23 °C for 14 days (Sharma, P. C., Meena, P. D., Singh, & Dhiraj, 2014). Subsequently, the culture fluid was filtered and winter wheat seeds

(variety Nationalna) soaked in it for 24 h (Bilay, V. I., 1982). A sterile nutrient medium as well as distilled and tap water were used for control. The seeds were laid out in Petri dishes on evenly moistened filter paper and incubated in a thermostat at 22-24 °C for 7 days.

The presence of phytotoxins in the culture filtrate was determined by the growth effects: seed germination and length of seedlings and roots. *S. sclerotiorum* isolates were moderately slightly toxic, if the inhibition of root growth or seedlings was 1-10 %, 11-29 % – medium toxic, when inhibition of growth of these organs was not less than 30 % – highly toxic. The experiment was repeated three times. Statistical processing of the experimental data was performed using Microsoft Office® for Microsoft Windows®.

### **Results and discussion.**

As a result of the tests, it was found that all isolates of *S. sclerotiorum* fungus, isolated from different plants and

#### **1. List of Sclerotinia sclerotiorum isolates used in the studies**

Place of screening of the affected plants		Plants	Isolate number
regions, city	districts		
Kyiv	Vasylkivskyi	Soybeans ( <i>Glycine max</i> L.)	Gm1, Gm2, Gm3, Gm4, Gm5, Gm6, Gm7
Zhytomyr	Popilnyanskyi	Sunflower ( <i>Helianthus annuus</i> L.)	Han8, Han9, Han10, Han11, Han12, Han13, Han14
Kyiv	Bilotserkivskyi	Sunflower ( <i>Helianthus annuus</i> L.)	Han15, Han16, Han17, Han18, Han19, Han20
Kyiv	Holosiivskyi	Dahlia ( <i>Dahlia</i> Cav.)	D21, D22, D23, D24, D25, D26, D27
Kyiv	Vasylkivskyi	Winter rapeseed ( <i>Brassica napus</i> L.)	Bn28, Bn29, Bn30, Bn31, Bn32
Ivano-Frankivsk	Gorodenkivskyi	Sowing peas, grain ( <i>Pisum sativum</i> L.)	Ps33, Ps34, Ps35, Ps36 Ps37
Kyiv	Yagotinskyi	Sunflower ( <i>Helianthus annuus</i> L.)	Han38, Han39, Han40, Han41, Han42

different geographical origin in Ukraine, led to a decrease in winter wheat seed germination, indicating that pathogenic phytotoxic metabolites were formed by the pathogen. Thus, laboratory germina-

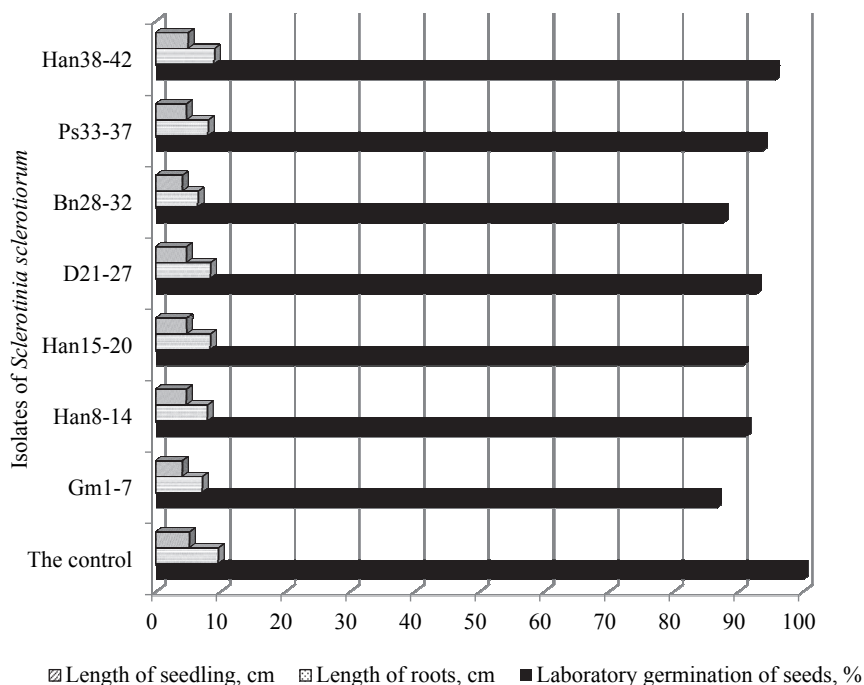
tion of seeds in variants with the culture fluid filtrate (CFF) of Gm4, Han19 and Gm5 isolates decreased the most – up to 82-83 %, which is 18-19 % less than in the control (Table 2). Other fungus iso-

## 2. Effect of culture filtrate of *S. sclerotiorum* isolates on seed germination and growth of winter wheat seedlings

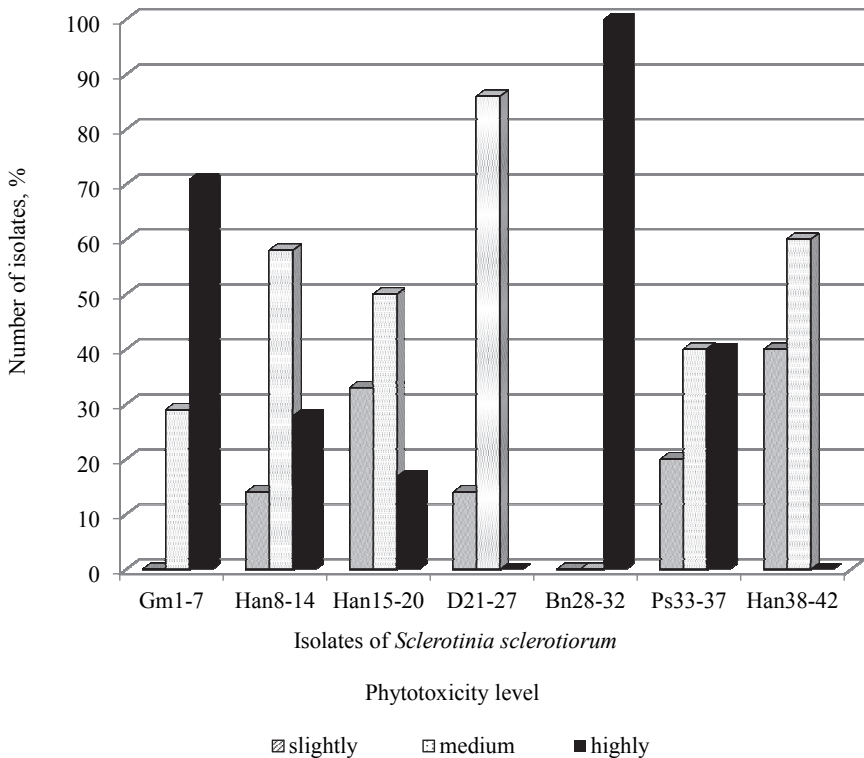
Isolates	Laboratory germination of seeds, %	Length, cm		Decrease in length			
		roots	seedlings	roots		seedlings	
				cm	%	cm	%
1	2	3	4	5	6	7	8
Gm1	88	6,58	3,24	3,00	45,6	1,86	57,4
Gm2	84	7,25	3,65	2,35	32,4	1,45	39,7
Gm3	93	8,01	4,75	1,59	19,9	0,35	7,37
Gm4	82	6,78	3,38	2,82	41,6	1,72	50,9
Gm5	83	6,99	4,44	2,61	37,3	0,66	14,9
Gm6	85	7,65	4,55	1,95	25,5	0,55	12,0
Gm7	91	6,6	4,38	3,00	45,5	0,72	1,6
Han8	95	9,20	4,47	0,40	4,40	0,63	14,0
Han9	89	6,08	3,84	3,52	57,9	1,26	32,8
Han10	98	8,43	4,41	1,17	13,9	0,69	15,7
Han11	97	8,39	4,42	1,21	14,4	0,68	15,4
Han12	84	7,77	4,70	1,83	23,6	0,40	8,5
Han13	86	7,35	4,53	2,25	30,6	0,57	12,6
Han14	89	8,17	4,18	1,43	17,5	0,92	22,0
Han15	95	8,71	4,70	0,89	4,10	0,35	7,5
Han16	95	9,22	4,75	0,38	9,90	0,66	13,9
Han17	98	8,75	4,44	0,87	9,90	0,66	14,9
Han 18	89	7,99	4,45	1,61	20,2	0,65	14,6
Han 19	82	6,36	4,75	3,24	50,9	0,35	7,4
Han 20	85	8,85	5,12	0,75	8,50	0,20	3,9
D21	96	9,12	4,62	0,48	5,30	0,48	10,4
D22	94	8,21	4,61	1,39	16,9	0,49	10,6
D23	95	8,61	4,89	0,99	11,5	0,21	4,3
D24	95	8,70	5,0	0,90	10,3	0,10	2,0
D25	90	7,90	4,32	1,70	21,5	0,78	18,0
D26	89	7,88	4,29	1,72	21,8	0,81	18,9
D27	90	8,28	5,00	1,32	15,9	0,1	2,0
Bn28	89	6,97	4,43	2,63	37,7	0,67	15,1
Bn29	84	6,25	4,21	3,35	53,6	0,89	21,1
Bn30	89	4,78	3,64	4,82	38,0	1,46	40,1
Bn31	86	6,80	3,76	2,80	41,2	1,34	35,6
Bn32	90	7,20	4,19	2,40	33,3	0,91	21,7
Ps33	98	9,67	4,72	0,69	7,70	0,38	8,0

**2. Effect of culture filtrate of *S. sclerotiorum* isolates on seed germination and growth of winter wheat seedlings (continuation)**

1	2	3	4	5	6	7	8
Ps34	91	7,02	4,31	2,58	36,8	0,79	18,3
Ps35	90	6,98	4,69	2,62	37,5	0,41	1,9
Ps36	94	7,85	5,00	1,85	23,6	0,1	2,0
Ps37	95	8,28	4,53	1,32	15,9	0,57	12,6
Han38	98	9,71	4,43	0,10	1,00	0,67	15,1
Han39	97	8,54	4,91	1,00	11,7	0,19	3,9
Han40	95	9,13	5,00	0,47	5,50	0,1	2,0
Han41	96	8,02	5,33	1,58	19,7	0,1	1,9
Han42	92	9,21	4,70	0,39	4,20	0,4	8,5
Control (nutrient medium)	100	9,6	5,1				
Control (H2O tap)	100	8,83	4,87				
Control (H2O distilled)	100	10,54	5,43				
ID05	0,30	0,07	0,05				



**Fig. 1. Results of phytotoxic action of isolates on winter wheat seeds**



**Fig. 2. Differentiation of phytotoxicity of isolates in *Sclerotinia sclerotiorum* populations, extracted from different geographical conditions and host plants**

lates caused a 2-17 % decrease in laboratory germination of seeds.

In addition to inhibition of seed germination, it has found inhibition of the length of the root system and seedlings of winter wheat plants. All the isolates of the *S. sclerotiorum* fungus under study had this effect. In particular, the reduction in root length of the plant compared to the control (sterile liquid nutrient medium) ranged from 0.1 to 4.8 cm or 1.0-57.9 %. The metabolites of the fungus adversely affected on the seedlings of the plants, causing inhibition of their growth by 0.1-1.86 cm (1.6-57.4 %).

*S. sclerotiorum* isolates from soybean and rapeseed plants in the Kyiv region of Vasylkivskyi district showed the most negative effect on the seed germination

index (Fig. 1). So, the seed germination was 86.6-87.6 % on average, due to the effect of phytotoxicity, it was less than in the control on 12.4-13.4 %. Cultural filtrate of fungus isolates from sunflower plants (Zhytomyr region, Popilnyanskyi district) reduced seed germination by 8.9%. Pathogen population from the same culture, but from Kyiv region, Bilotserkivskyi district, also had a negative effect on the similarity, which was 90.7 % (less than the control by 9.3 %). *S. sclerotiorum* isolates, removed from dahlia plants in Kyiv, reduced of the seed germination by 7.3 % and from peas (Ivano-Frankivsk region, Gorodenkivskyi district) – by 6.4 %. Isolates of the fungus population extracted from

sunflower plants (Kyiv region, Yagotinsky district), were the least phytotoxic in influencing the germination of wheat seeds and reduced the laboratory germination of seeds by only 4.4 %.

Analysis of the phytotoxicity ratio of isolates in *S. sclerotiorum* populations, removed from different geographical conditions and host plants, showed that all pathogen isolates (100%) from rapeseed plants (Kyiv region, Vasylykiv district) and 71% of isolates from plants were highly toxic soybeans (Fig. 2). Fungus isolates from sunflower plants (Kyiv region, Yagotinsky district) and dahlia (Kyiv) did not characterize of high toxicity against winter wheat seeds. The medium-toxic isolates (86 and 40 % respectively) were dominated in these populations of white mold pathogen.

### Conclusions.

It was found that all 42 isolates of *S. sclerotiorum* fungus isolated from soybean, sunflower, rapeseed, dahlia and pea plants of different geographical origin in Ukraine had phytotoxic effects on seed germination, root system growth and winter wheat seedlings.

The conducted studies revealed the intraspecific differences of individual *S. sclerotiorum* isolates by the degree and spectrum of phytotoxicity. Strong phytotoxic activity was shown by *S. sclerotiorum* isolates, extracted from soybean and rapeseed plants (Kyiv region, Vasylykiv district), which reduced seed germination by an average of 12.4-13.4% compared to control. Isolates of the fungus populations extracted from sunflower plants (Kyiv region, Yagotinsky district) were the least phytotoxic in the germination of wheat seeds and reduced the laboratory germination of seeds by only 4.4%.

The culture filtrate of the fungus *S. sclerotiorum* caused a decrease in the length of the root system of the plants compared to the control (sterile liquid nutrient medium) by 1.0-57.9%, and seedlings of seeds, respectively, by 1.6-57.4 %.

It was found that all the isolates of the pathogen extracted from rapeseed plants under conditions of the Kyiv region of Vasylykiv district were highly toxic. Among the isolates of the fungus from the affected sunflower plants (Kyiv region, Yagotinsky district) and dahlia (Kyiv) were not very toxic for winter wheat seeds. In these populations, the white rot pathogen was dominated by medium-toxic isolates, 86 and 40 %, respectively.

It has been shown, that secondary metabolites of *S. sclerotiorum* culture fluid filtrate had a prolonged action: the laboratory germination decreased on 2.5-18.3 % compared to the control, the length of the root system and seedlings, in average respectively – on 53.6 and 57.4 %.

The high toxigenic activity some of *S. sclerotiorum* isolates, as a component of a complex infection of many plants, should be taken into account as a criterion for the pathogen's harmfulness and taken into account during the development of artificial infectious backgrounds and for the organization of protection measures.

Further studies should address the nature of fungal inhibitory substances and their effect on plant morphometric parameters.

---

### References

1. Boland, G. J., Hall R. (1994). Index of Plant Hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal of Plant Pathology. 16. 93-108.

2. Kyryk, M.M., Pikovskyi, M.Y., Azaiki, S. (2012). Diagnostic signs of diseases of vegetable crops and potato. Kyiv: Phenix. 175.
3. Kirik, N. N., Koltunov, V. A., Borodai, V. V. (2001). Patologicheskiye izmeneniya v korneplodakh morkovi pod vliyaniyem vzbuditeley gniley v period khraneniya. [Pathological changes in roots of carrot caused by fungi during the storage]. Mikologiya i fitopatologiya. 35. 6. 48-51. (In Russian).
4. Pikovskyi, M., Kyryk, M., Arnauta, N. (2018). Shkidlyvist' biloyi hnyli horokhu. [The harmfulness of white mold peas]. Zahist i karantin roslin. 64. 143-149. (In Ukrainian).
5. Bolton, M. D., Thomma, B. P. H. J., Nelson, B. D. (2006). Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Mol. Plant Pathol. 7. 1. 1-16. doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00316.x PMID: 20507424
6. Sharma, P. C., Meena, P. D., Singh, Dhiraj. (2014). Effect of Sclerotinia sclerotiorum culture filtrate on seed germination and seedling vigour of Indian mustard (Brassica juncea cv. Rohini). Journal of Oilseed Brassica. 5. 2. 158-161.
7. Svabova L., Lebeda A. (2005). In vitro selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. J. Phytopathol. 153. 52-64. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00928.x>
8. Parveen, Shazia & Wani, Ab. Hamid & Bhat, Mohd. (2019). Effect of culture filtrates of pathogenic and antagonistic fungi on seed germination of some economically important vegetables. Brazilian Journal of Botany. 6. 133-139. <https://doi.org/10.21472/bjbs.061212>
9. Suthar, Ramchandra & Bhatt, Daksha & Bhatt, Prashant. (2014). Effect of culture filtrate of Fusarium equiseti on seed germination and seedling growth of cumin (Cuminum cyminum). Indian Phytopath. 67.2. 193-194.
10. Ibatsam Khokhar, Muhammad Saleem Haider, Irum Mukhtar, Amna Ali, Sobia Mushtaq, Muhammad Ashfaq. (2013). Effect of Penicillium species culture filtrate on seedling growth of wheat. International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science. 3.1. 24-29.
11. Garuba, T., Abdulrahman, A.-A., Olan, G. S., Abdulkareem, K. A., Amadi, J. E. (2015). Effects of Fungal Filtrates on Seed Germination and Leaf Anatomy of Maize Seedlings (Zea mays L., Poaceae). Journal of Applied Sciences and Environmental Management. 18. 4. 662-667. <http://dx.doi.org/10.4314/jasem.v18i4.15>
12. Bilay, V. I., editor. (1982). Metody eksperimental'noy mikologii. [Methods of Experimental Mycology]. Kiev: Nauk. Dumka. 550 p. (In Russian).

**М. Й. Піковський, М. М. Кирик, В. В. Бородай (2020). ФІТОТОКСИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КУЛЬТУРАЛЬНИХ ФІЛЬТРАТІВ ІЗОЛЯТІВ МІКРОМІЦЕТУ SCLEROTINIA SCLEROTIORUM (LIB.) DE BARY, ВИЛУЧЕНИХ З ФІЛОСФЕРИ РІЗНИХ РОСЛИН-ГОСПОДАРІВ.**

BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 11(1): 60-68.

<http://journals.nubip.edu.ua/>

<https://doi.org/10.31548/biologiya2020.01.060>

**Анотація.** Представлено результати досліджень впливу культуральних фільтратів 42 ізолятів гриба *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary різного географічного походження на схожість насіння та ріст проростків рослин пшениці озимої. Усі досліджувані ізоляти проявляли фітотоксичну дію, яка полягала у зниженні схожості насіння, інгібуванні росту кореневої системи та проростків. Найбільш негативний вплив на показники схожості

насіння проявляли ізоляти *S. sclerotiorum*, вилучені із рослин сої та ріпаку в умовах Київської області Васильківського району. Їхня фітотоксична дія зумовлювала зниження схожості насіння на 12,4-13,4 % менше порівняно з контролем. Досліджувані ізоляти *S. sclerotiorum* спонукали також зменшення довжини кореневої системи рослин і пригнічення росту проростків порівняно із контролем у середньому від 1,0 до 57,9 %.

Установлено диференціацію ступенів фітотоксичності ізолятів у популяціях *S. sclerotiorum*, вилучених із різних географічних умов та рослин-господарів. Зокрема, високий ступінь фітотоксичності мали 71-100 % ізолятів гриба, вилучених із рослин сої та ріпаку в умовах Київської області Васильківського району. Ізоляти патогену із уражених рослин соняшнику (Яготинський район Київської області) та жоржини (м. Київ) характеризувалися слабкою та середньою фітотоксичністю.

**Ключові слова:** фітотоксичність, фільтрат культуральної рідини, ізоляти, популяція, *Sclerotinia sclerotiorum*, ростові показники

---

## ПОШИРЕННЯ ВІРУСУ ЗВИЧАЙНОЇ МОЗАЇКИ КВАСОЛІ З НАСІННЯМ *PHASEOLUS VULGARIS* cv ЧЕРВОНА ШАПОЧКА

---

**А. М. КИРИЧЕНКО**, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, Інститут мікробіології і вірусології НАНУ  
E-mail: kirangel.07@meta.ua, Orcid ID 0000-0002-6098-1467

**І. О. АНТИПОВ**, кандидат сільськогосподарських наук, Національний університет біоресурсів і природокористування України  
E-mail: antigav@rambler.ru

**К. В. ГРИНЧУК**, кандидат біологічних наук, Національний університет біоресурсів і природокористування України  
E-mail: blackgrampus@ukr.net

**А. Ф. ЛІХАНОВ**, кандидат біологічних наук, Національний університет біоресурсів і природокористування України  
E-mail: likhanov.bio@gmail.com, Orcid ID 0000-0001-6580-7241

**Анотація.** Вірус звичайної мозаїки квасолі (ВЗМК) – один із найбільш шкочинних та широко розповсюджених вірусів бобових. Збудник може передаватися насінням і пилком із досить високою частотою. За ефективного поширення векторами на сприйнятливій культурі навіть незначна кількість інфікованого насінням в посівному матеріалі може призвести до масового ураження культури. В Україні ВЗМК поширений в усіх регіонах вирощування квасолі й може спричинити серйозні втрати врожаю. Метою цього дослідження було дослідити рівень передавання вірусу з насінням квасолі *Phaseolus vulgaris* cv Червона шапочка. Позаяк висока частота передавання вірусу з насінням напряду залежить від інфікування зародку, ми мали на меті дослідити наявність вірусної інфекції в репродуктивних тканинах квасолі. Для дослідження вертикальної передачі ВЗМК із пилком було проведено тестування РНК вірусу (методом ПЛР) в пилкових зернах. Дослідження проводилися біологічними (механічна інокуляція вірусів, визначення інфекційності вірусу), молекулярно-біологічними методами (екстрагування РНК із рослинних тканин, полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією) та методом люмінесцентної мікроскопії. Показано, що під час проростання насіння рослин *P. vulgaris* cv Червона шапочка, інфікованих ВЗМК, 77 % молодих проростків були уражені вірусом, що свідчить про високий рівень передавання вірусу з насінням цього сорту. Вірусну РНК було виявлено в генеративних органах рослин і деяких частинах насінини та квітки. Підтверджена наявність вірусу в пилкових зернах рослин *Phaseolus vulgaris*. У цитоплазмі та ядрі клітин зародка виявлено дифузні зернисті вірусні включення.

**Ключові слова:** вірус звичайної мозаїки квасолі (ВЗМК), насіннева інфекція, полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР)

### **Актуальність.**

Передавання вірусів із насінням відіграє ключову роль у розповсюдженні та виживанні багатьох серйозних вірусних та віроїдних хвороб рослин. Інфіковане насіння є найважливішим джерелом вірусів у природі й агропромислому рослинництві. У природних умовах єдина інфікована рослина може слугувати джерелом інфекції для вторинного поширення вірусу відповідними векторами. Насіннева передача вірусу характерне лише для певних вірусів або комбінацій вірус-рослина, а наявність вірусу на/в насінні не завжди призводить до інфікування проростків. Деякі віруси зустрічаються лише на насінневій оболонці або в сім'ядолях чи зародку. У процесі дозрівання і висушування насіння частина з них зберігається, інші – елімінуються. Наразі відомо 231 вірусів і віроїдів, здатних передаватися з насінням. Більшість із них належать до родів *Potyvirus*, *Nepovirus*, *Cryptovirus*, *Illavirus*, *Tobamovirus*, *Potexvirus*, *Comovirus*, *Carlavirus*, *Carmovirus*, *Cucumovirus*, *Sobemovirus*, *Furovirus*, *Bromovirus* та *Tymovirus*. Понад 70 вірусів, що передаються з насінням належать до родини *Fabaceae* (частіше, ніж із насінням будь-яких інших культурних рослин). Деякі віруси, основними хазяями яких є не зернові культури, здатні до передавання з насінням у посівах бобових [Sastry, 2013].

Вірус звичайної мозаїки квасолі (ВЗМК) – один із найпоширеніших і шкодочинних вірусів квасолі [Kyrychenko & Kovalenko, 2018 ; Maule & Wang, 1996 ]. ВЗМК спричинює значні втрати врожаю, які становлять 6-98 % [Hampton, et al., 1982; Varma, 1988]. Вірус передається з високою частотою з насінням *P. vulgaris* [Schmidt, 1992] і може зберегти свою

інфекційність та життєздатність у насінні до 38 років [Walters, 1962a]. Відсоток інфікованого насіння коливається від 0,67 % до 98 % [Deligoz & Soken, 2013; Nema et al., 2014; Nordenstedt et al, 2017; Worrall et al., 2015] і залежить від низки чинників, зокрема сорту рослини-хазяїна, штамму вірусу, стадії розвитку рослини на момент інфікування, а також умов навколишнього середовища [Sastry, 2013]. Припускають, що епідемії ВЗМК у 1977 році в Європі та Америці, були спричинені саме використанням інфікованого посівного матеріалу і вирощуванням сортів квасолі, які раніше вважалися стійкими до більшості штамів ВЗМК [Worrall et al., 2015]. Відповідно до епідеміологічного значення пилку в розповсюдженні вірусів, ВЗМК було віднесено до категорії С [Sastry, 2013]. Віруси, що належать до цієї категорії виявляються в пилку та інфікують рослини під час перехресного запилення, що призводить до формування зараженого насіння в жіночих рослинах. Таке поширення вірусів, очевидно, не становить значної епідеміологічної загрози, позаяк у літературі відсутні відомості щодо вертикального передавання ВЗМК із пилком у природних умовах.

З огляду на важливе значення інфікованого насіння в розповсюдженні хвороб та зберіганні вірусів, ми мали на меті дослідити рівень передавання ВЗМК, що циркулює в Україні з насінням *P. vulgaris* cv Червона шапочка.

### **Матеріали і методи дослідження.**

Екстракти рослин квасолі сорту Червона шапочка, вирощених з інфікованого ВЗМК насіння використовували як інокулюм для інфікування квасолі

сорту Первомайська. Інокуляцію проводили механічно за допомогою стандартного методу натирання листків.

Для приготування інокулюму 1 г вірусомісного матеріалу (молоді боби з попередньо видаленим насінням, зріле насіння, насіннева оболонка, зародки, ендосперм та окремі частини квітки) подрібнювали в ступці з додаванням 1 мл цитратного буфера (50 мМ цитрату натрію, 20 мМ діетилтіокарбаматної кислоти, 2% полівінілпіролідону). Отриманий екстракт фільтрували й центрифугували за 3000 об/хв упродовж 5 хв. До 50 мкл супернатанту додавали 450 мкл цитратного буфера і використовували для проведення ПЛР-аналізу або біологічного тестування (визначення інфекційності) [Sipahioğlu et al., 2007].

Для визначення ступеня насінневої передачі вірусу сто п'ятдесят насінин, отриманих від інфікованих вірусом рослин *P. vulgaris* cv Червона шапочка висівали в умовах теплиці у весняно-літній період. Проростки, вирощені зі здорового насіння, слугували контролем досліджень. Перед посівом насіння знезаражували промиванням в 4 % соляній кислоті і 10 % розчині хлорного вапна. Реакції досліджуваних рослин оцінювали щодня впродовж 4 тижнів з моменту появи перших справжніх листків. Крім того, всі рослини були протестовані за допомогою ОТ-ПЦР. Ступінь насінневої передачі вірусу розраховували за допомогою рівняння:

$$P = \frac{n \cdot 100}{N},$$

де P – ступінь насінневої передачі вірусу, n – кількість інфікованих рослин; N – загальна кількість рослин [Доспехов, 1985].

Для ампліфікації фрагмента вірусного генома довжиною 391 п.н., що

відповідає ділянці 9267–9657 гена білка оболонки ВЗМК, використовували праймери (5'-tgtggtacaatgctgtgaagg-3' та 5'-gcctcatctgtgctactgct-3'), розроблені нами [Антіпов та ін., 2016].

Тотальну РНК ВЗМК із рослинного матеріалу виділяли використовуючи набір для екстракції ДНК/РНК Ribo-Sorb (AmpliSens, Росія). Синтез кДНК проводили кітами Reverta-L-100 (AmpliSens, Росія) згідно з інструкцією виробника. Реакційна суміш об'ємом 15 мкл містила 1 × реакційний буфер (0,2 мМ dNTPs, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>), 10-50 нг кДНК та 0,5U Taq полімерази. Усі праймери використовували в кінцевій концентрації 5 пмоль. Ампліфікацію проводили в ампліфікаторі «Терцик» TP4-PCR-01 (ДНК технології, Росія). Розміри ампліфікованих фрагментів визначали порівнюючи зі стандартними маркерами довжин ДНК LadderPlus 100 bp ДНК (Fermentas, США).

Вірусні включення виявляли методом люмінесцентної мікроскопії з застосуванням акридинового оранжевого (розведення – 1: 10000) [Гольдин, 1963; Паушева, 1988]. Час фарбування флуорохромом (за рН – 5,6) і подальшого відмивання тканин у дистильованій воді – 5 хв. Флуоресценцію нуклеїнових кислот у клітинах гасили 5 % трихлороцтовою кислотою (ТХО). Для цього ще нефарбовані зрізи обробляли ТХО 15 хв на водяній бані за 90 °С [Гольдин, 1963; Паушева, 1988].

### Результати дослідження та їх обговорення.

Вірус звичайної мозаїки квасолі є збудником мозаїчної хвороби різних сортів квасолі. В Україні вірус широко розповсюджений у всіх регіонах ви-

рощування квасолі і спричиняє значні втрати врожаю. Встановлено наявність вірусної інфекції в посівах квасолі, як сортів що проходили сортовипробувальний термін у природному фоні, так і внесених до Державного Реєстру сортів, придатних до вирощування в Україні [Kyryuchenko & Kovalenko, 2018; електронний ресурс <https://sops.gov.ua/uploads/page/5bbdf6a297647.pdf>]. Рослини сорту Червона шапочка вирізнялися серед досліджуваних сортів вищим відсотком уражених рослин та суворішими симптомами у вигляді некротизації листкової пластинки, низькорослості та деформації стебла й листків. З огляду на це, метою даної роботи було дослідити наявність вірусу в різних частинах насінини та визначити ступінь передавання ВЗМК із насінням квасолі цього сорту.

Зразки листя *Phaseolus vulgaris* cv Червона шапочка із симптомами у вигляді мозаїчності, зморшкуватості,



**Рис. 1. Симптоми вірусного ураження на квасолі *Phaseolus vulgaris* L.**

сті, деформацій, закручування краю листкової пластинки донизу і зменшення розміру листя, були зібрані в насадженнях квасолі промислових та приватних господарств Київської області (рис. 1). В інфікованих рослин спостерігалось передчасне опадання листя, на них утворювалося менше бобів, кількість насінин значно зменшувалась, що призводило до значного зниження врожаю. Насіння квасолі з інфікованих рослин збирали для подальших лабораторних аналізів.

Насіння квасолі, зібране випадковим чином з інфікованих рослин квасолі, висівали в теплиці в трьох повторях по 50 насінин у кожному. Відсоток заражених проростків, що оцінювали за наявністю вірус-специфічних симптомів, складав 81 %, 75 % та 75 % у кожному повторенні відповідно. Середня кількість інфікованих рослин складала 85 %. Наявність ВЗМК у всіх симптоматичних рослин було підтверджено за допомогою ПЛР (табл. 1).

Отримані дані свідчать про високу частоту передавання вірусу з насінням сорту Червона шапочка. Такий рівень зараженості насінням може бути зумовлений сортовими характеристиками рослин (низька стійкість до вірусу) або високою патогенністю штаму, позаяк ВЗМК, що циркулював в Україні раніше передавався з частотою 35 % [Московець та ін., 1971]. Слід зазначити, що вірусна інфекція не впливала на схожість насіння і 96-98 % проростків були життєздатними (табл. 1).

У наших попередніх дослідженнях показано, що ВЗМК, який циркулює в Україні, відрізняються від описаних раніше за вірулентністю та реакціями рослин-індикаторів. Було висловлено припущення, що ізолят

## 1. Результати детекції ВЗМК в насінні квасолі сорту Червона шапочка

Проростки	Повтори експерименту*		
	I	II	III
Кількість пророслих насінин	48	49	49
Кількість інфікованих рослин за оцінкою інфекційності екстрактів	39	37	37
Кількість інфікованих рослин, виявлених методом ЗТ-ПДР	41	37	37
Рівень насіннєвої інфекції, (%)	81	75	75

\*50 насінин в кожному повторі

належить до А серотипу ВЗМК - вірусу звичайної некротичної мозаїки квасолі [Курчченко & Kovalenko, 2018]. За результатами патотипування із використанням ряду рослин-диференціаторів, ізолят було класифіковано як некротичний штам ВЗМК В серотипу. Результати, отримані в даній роботі, свідчать про інші незвичайні властивості ізоляту – високий рівень передавання вірусу з насінням.

Перші симптоми вірусної інфекції на рослинах, вирощених із зараженого насіння, з'являлися через 3-4 тижні у вигляді світло-зеленої мозаїки на перших трійчастих листках. Уражене листя деформувалося, грубішало і ставало крихким. Плямистість і деформація перших листків свідчить про те, що первинне зараження відбулося саме через насіння [Bos, 1971]. На наступних трійчастих листках з'явилися типові симптоми захво-



Рис. 2. Симптоми вірусного ураження на рослинах, вирощених із інфікованого насіння (А, В), боби інфікованої (зверху) та здорової рослини (знизу) (С)

рювання – світло-зелена й жовтувата плямистість листкової пластинки та темно-зелене забарвлення жилок (рис. 2а, в). З часом хлоротичні листки зморщувались, а їхні краї згорталися донизу. У фазі дозрівання насіння інфіковані рослини були кволими, з деформованими плямистими бобами, у більшості з яких насіння було несформоване або містило невелику кількість насінин (рис. 2с). Симптоми вірусного ураження в рослин, вирощених із зараженого насіння, були значно суворішими, ніж такі в рослин, інфікованих механічно в експериментальних умовах.

Для виявлення вірусу в різних частинах насінини чи рослини, з уражених рослин зрізали квітки та молоді боби. Насіннева оболонка й зародок насінини були повністю відокремлені. Досліджували інфекційність екстрактів, отриманих із бобів, насінневої оболонки та зародка. Паралельно проводили ПЛР зі специфічними для вірусу праймерами. Механічну інокуляцію квасолі сорту Первомайська для підтвердження інфекційності екстрактів проводили в контрольованих умовах. Типові симптоми ВЗМК в інокульованих рослин з'явилися через 12-16 днів після інокуляції екстрактами із бобів та насінневих зародків. Наявність ВЗМК методом ПЛР було встановлено у всіх випробуваних зразках (табл. 2).

Відсутність симптомів на рослинах, інокульованих екстрактами з насінневої оболонки, можна пояснити низькою концентрацією вірусу на поверхні насінини, позаяк наявність вірусної РНК було підтверджено методом ПЛР (рис. 3).

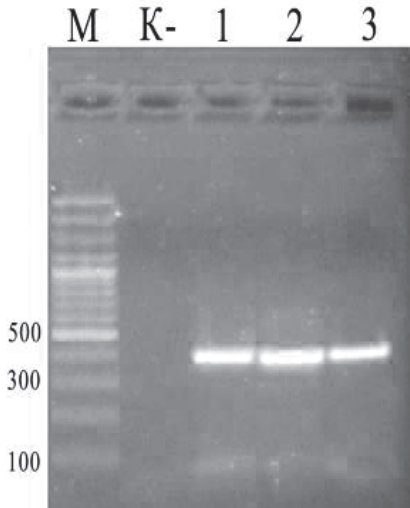
Фрагменти вірусного геному були виявлені також у різних частинах квітки та молодих бобах (рис. 4). Найвища концентрація вірусу спостерігалась у бобах, чашечці та зав'язі. У віночку та тичинках концентрація вірусу була значно меншою. Також було встановлено наявність вірусного геному в пилку, у той час як ВЗМК у приквіткових листках не детектувався.

Важливою діагностичною ознакою присутності в рослинах ВЗМК є утворення в живих клітинах особливих включень – нуклеопротейдних комплексів. Вірусні включення являють собою ізометричні кристали 0,4-0,8 мкм у поперечнику й овальні зернисті тільця розміром 2-6 мкм, які демонструють характерні хімічні реакції на білок [Walters, 1962a]. Під час дослідження інфікованих зародків квасолі методами флуоресцентної мікроскопії в структурі ядер і цитоплазми клітин зовнішнього епідермісу, а також середнього шару внутрішнього інтегумента були виявлені характерні для ВЗМК овальні зернисті включення (рис. 5).

Таблиця 2. Наявність ВЗМК в бобах та інфікованому насінні

Метод аналізу	Джерело вірусу		
	Боби	Зародок	Насіннева оболонка
ЗТ-ПЛР	+	+	+
Інфекційність екстрактів	+	+	-

+: наявність продукту ампліфікації, системна мозаїка на інокульованому листі; -: відсутність симптомів

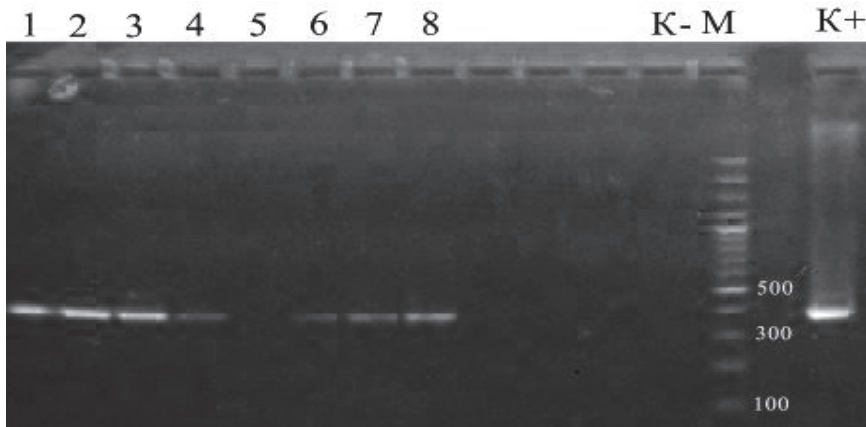


**Рис. 3. Визначення ВЗМК в екстрактах квасолі методом ЗТ-ПЛР із застосуванням вірус специфічних праймерів:**  
 1 – незрілі боби, 2 – зародки, 3 – насіннева оболонка,  
 К- – негативний контроль,  
 М – (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder SM0322) – маркер довжин фрагментів ДНК

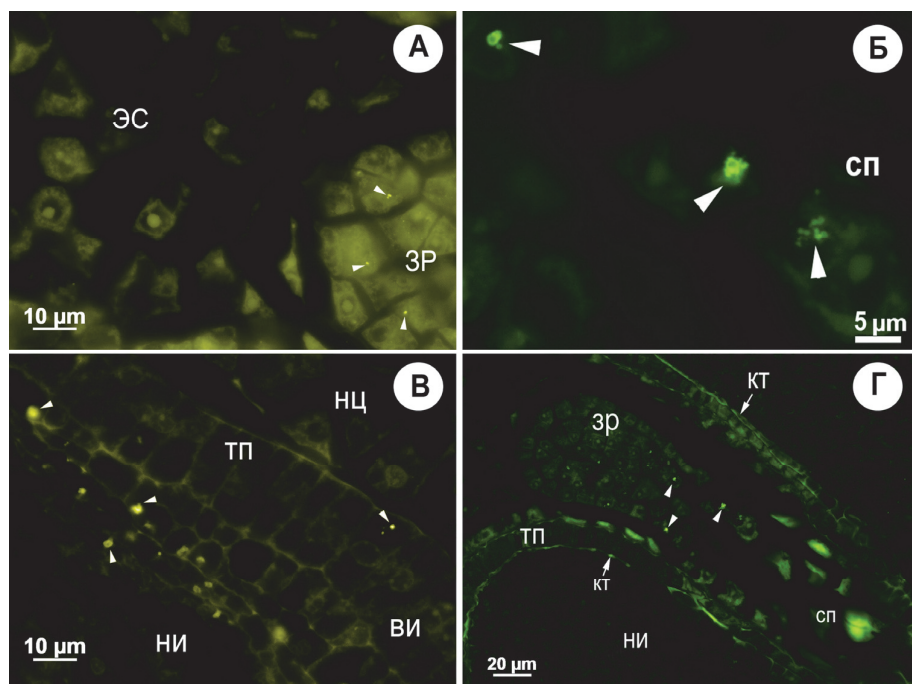
Обробка тканин зародка гарячою (90 °С) трихлороцтовою кислотою дозволила повністю погасити світіння нуклеїнових кислот у ядрах і ядерцях і значно посилити світіння білкових включень (рис. 5, а). В окремих клітинах зернисті включення вірусів утворювали невеликі агрегації розміром 2,8-3,0 мкм. В ендотелії вони траплялися значно рідше (рис. 5, в). У клітинах нуцеллуса й ендосперму вірусних включень не виявлено (рис. 5, а, в). Найбільшу кількість клітин з вірусними включеннями було виявлено в зародку й суспензорі (рис. 5, б, г), зокрема в клітинах зародка містилося до 20-27 % включень.

### Висновки та перспективи.

Отримані дані свідчать про високий рівень передавання вірусу з насінням квасолі сорту Червона шапочка. Щоби визначити, чи є такий рівень насінневої передачі вірусу особливістю досліджуваного ізоляту, надалі планується про-



**Рис.4. Визначення ВЗМК в екстрактах квасолі методом ЗТ-ПЛР із застосуванням вірус специфічних праймерів:** 1 – пилок, 2 – боби, 3 – чашолистки, 5 – приквіток, 6 – пилок з фрагментами тичинки, 7 – тичинки, 8 – зав'язь, К- – негативний контроль, К+ – позитивний контроль, М – (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder SM0322) – маркер довжин фрагментів ДНК



**Рис. 5. Вірусні включення в тканинах зародка і сімязародків *Phaseolus vulgaris* L.:** А – локалізація ядерних вірусних включень у зародку й їх відсутність в ендоспермі; Б – дифузні вірусні включення в клітинах суспензорія; В – вірусні включення в зовнішніх шарах клітин внутрішнього інтегумента; Г – відкладення кутикули й локалізація вірусних включень у базальній частині зародка; ТП – інтегументальний тапетум, КТ – відкладення кутикули на зовнішніх і внутрішніх периклініальних стінках ендотелію; НИ – зовнішній інтегумент; ВИ – внутрішній інтегумент, НЦ – нуцеллус; ЗР – зародок; ЕС – ендосперм; СП – суспензорія; стрілками показані вірусні включення. Фарбування акридиновим помаранчевим (1 : 10 000)

вести подібні дослідження з використанням насіння різних сортів квасолі, особливо тих, що вирощуються в Україні. На основі отриманих результатів можна зробити висновок, що насіння, уражене вірусом, має велике значення в поширенні хвороби. Саме тому стратегії менеджменту та контролю вірусних захворювань, спричинених ВЗМК потребують значної переоцінки. Позаяк штами ВЗМК інфікують обмежений діапазон рослин, а основними хазяями є, як правило, однорічні рослини, передавання вірусу з насінням може

слугувати одним з основних способів виживання вірусу від сезону до сезону та джерелом інфекції в природних екосистемах. Методом ПЛР було встановлено наявність вірусної РНК у генеративних органах рослини й деяких частинах насінини та квітки. Результати досліджень свідчать про високу чутливість ПЛР та використаних праймерів, які можна успішно застосувати для діагностики вірусів у програмах сертифікації та/або дослідженнях карантинних служб. Вивчення локалізації вірусних включень у тканинах під час розвитку/

дозрівання насіння може бути корисним для встановлення ймовірних шляхів переміщення вірусу в рослині.

Оскільки вірус передається насінням із високою частотою, використання безвірусного посівного матеріалу може запобігти первинному зараженню культури. Ефективним захистом від ВЗМК може бути вирощування сортів із геном стійкості «I»; позаяк цей ген перешкоджає утворенню вірус-інфікованого насіння, даний підхід може бути дієвим засобом для уникнення епідемічної ситуації, спричиненої ВЗМК.

### References

1. Antipov, I., Hrynychuk, K., Duplyak, O. (2016). Rozrobka PLR-system dlya identyfikatsiyi virusu zvychnoyi mozayiky kvasoli [Development of PCR systems for identification of bean common mosaic virus]. *Naukovyy visnyk NUBIP Ukrainy - Scientific herald of NULES of Ukraine. Series: biology, biotechnology, ecology.* 234, 40–46 [in Ukrainian]. Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvnuai\\_biol\\_2016\\_234\\_7](http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvnuai_biol_2016_234_7).
2. Bos, L. (1971). Bean Common Mosaic Virus. C.M.I. A.A.B. Description of Plant Viruses, 73, 4. режим доступу: <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=073>
3. Deligoz, I., Soken, M.A. (2013). Differentiation of Bean Common Mosaic Virus (BCMV) and Bean Common Mosaic Necrosis Virus (BCMNV) strains infecting common bean in Samsun province. *J Turk Phytopath.* 7, 1–14. режим доступу: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/72887>
4. Dospekhov, B.A. (1985). Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezul'tatov issledovaniy) [Field Experience Method]. Agropromizdat, Moscow. 416 p. [in Russian].
5. Goldin, M.I. (1963). Virusnye vkljueniya v rastitel'noj kletke i priroda virusov. [Viral inclusions in plant cell and the nature of viruses]. Izdat. AN SSSR, Moskva - Akad. Nauk USSR, Moscow. 204 p. [in Russian].
6. Hampton, R., Waterworth, H., Goodman, R.M., Lee, R. (1982). Importance of seed-borne viruses in crop germplasm. *Plant Dis.* 66, 977–978. режим доступу: <http://euro-pepmc.org/abstract/AGR/IND82118564>
7. Hema, M., Sreenivasulu, P., Patil, B.L., Kumar, P.L., Reddy, D.V.R. (2014). Tropical food legumes: virus diseases of economic importance and their control. *Adv Virus Res.* 90, 431–505. doi: 10.1016/B978-0-12-801246-8.00009-3.
8. Kyrychenko, A.N., Kovalenko, A.G. (2018). Bean common mosaic in the Kiev region: etiology of disease and pathogen identification. *Mikrobiol. Z.*; 80(4), 96–107. DOI: 10.15407/mikrobiolj80.04.096.
9. Maule, A.J., Wang, W. (1996). Seed transmission of plant viruses: a lesson in biological complexity. *Trends in Microbiol.* 4(4), 153–158. doi: 10.1016/0966-842x(96)10016-0.
10. Mockovets', S.M., Kraev, V.G., Porembc'ka, N.B., Bilyk, L., Baratova, D.F. (1971). Virusy ta virusni zakhvoryuvannya kul'tur bobovykh v Ukraini [Viruses and virus diseases of legume cultures in Ukraine]. *Naukova dumka, Kyiv.* 136 p. [in Ukrainian].
11. Nordenstedt, N., Marcenaro, D., Chilagane, D., Mwaipopo, B., Rajamaki, M.L., Nchimbi-Msolla, S., Njau, P.J.R., Mbanzibwa, D.R., Valkonen, J.P.T. (2017). Pathogenic seed-borne viruses are rare but Phaseolus vulgaris endornaviruses are common in bean varieties grown in Nicaragua and Tanzania. *PLoS ONE.* 12:e0178242. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178242>
12. Pausheva Z.P. Praktikum po tsitologii rasteniy. – 4-e izd., pererab. i dop. – M.: Agropromizdat, 1988. – 271 s.;
13. Sastry, K.S. (2013). Seed-borne plant virus diseases. Springer Publishers, New Delhi, pp 327. doi: 10.1007/978-81-322-0813-6
14. Schmidt, H.E. (1992). Bean mosaics. In: Chaube H.S., Singh U.S., Mukhopadhyay

- A.N., Kumar J., editors. Plant Diseases of International Importance. Vol. II, Prentice Hall, New Jersey; 40–73.
15. Sipahioğlu, H.M., Ocak M., Usta M. (2007). Comparison of three conventional extraction methods for the detection of plant virus/viroid RNAs from heat dried high-phenolic host leaves. *Asian J. Plant Sci.* 6(1), 102–107. doi: 10.3923/ajps.2007.102.107.
16. State register of plant varieties suitable for dissemination in Ukraine in 2018. (2018). Retrieved from <https://sops.gov.ua/uploads/page/5bbdf6a297647.pdf> [in Ukrainian]
17. Varma, A. (1988). The economic impact of filamentous viruses. In: Milne R.G. editor. *The Plant Viruses: The Filamentous Plant Viruses*, Plenum Press, New York and London; p. 331–407.
18. Walters, E.C. (1962a). Thirty eight years behind the times and still they germinate. *Assoc Off Seed Anal News.* 36, 8.
19. Worrall, E.A., Wamonje, F.O., Mukeshimana, G., Harvey, J.J.W., Carr, J.P., Mitter N. (2015). Bean common mosaic virus and Bean common mosaic necrosis virus: relationships, biology and prospects for control. *Adv. Virus Res.* 93, 1–46. doi: 10.1016/bs.aivir.2015.04.002
- 

**Angelina Kyrychenko, Kateryna Hrynychuk, Ihor Antipov, Artur Likhanov (2020).**

**SEED TRANSMISSION OF BEAN COMMON MOSAIC VIRUS IN PHASEOLUS VULGARIS CV CHERVONA SHAPOCHKA. BIOLOGICAL SYSTEMS:**

**THEORY AND INNOVATION**, 11(1): 69-78. <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/article/view/13993>. <https://doi.org/>. <https://doi.org/10.31548/biologiya2020.01.069>.

**Abstract.** *Bean common mosaic virus (BCMV) is one of the most harmful and widespread bean viruses. The pathogen can be transmitted with seeds and pollen with a fairly high frequency. With efficient spread by vectors to susceptible crops, even a low level of seed infection can lead to an epidemic situation. In Ukraine BCMV is widespread in all dry bean growing areas and may cause serious crop losses. The aim of this study was to investigate the level of Bean common mosaic virus seed transmission in Phaseolus vulgaris cv Chervona shapochka. Whereas high incidence of seed transmission occurred in direct relation to virus invasion of an immature embryo we tended to follow the virus infection in reproductive tissues of bean. To determine the possibility of vertical transmission of BCMV via pollen, detection of virus RNA in pollen grains by PCR has been carried out. In the study biological methods (mechanical inoculation of viruses, detection of virus infectivity in indicator plants) and molecular biological techniques (total RNA extraction from the plant tissues, reverse transcription polymerase chain reaction) were used. It was shown P. vulgaris cv Chervona shapochka transmitted the BCMV strain in 77 % of the seed produced by infected plants. The date obtained indicates a high level of seed transmission of the virus. According to the findings virus infected seeds have a great value in disease spreading. The viral RNA has been detected in plant generative organs and some components of the seed and flower. Also virus particles were found in pollen grains of Phaseolus vulgaris plants. Diffuse granular viral inclusions were detected in the cytoplasm and nucleus of developing embryo cells.*

**Keywords:** *Bean common mosaic virus (BCMV), seed infection, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)*

---