

ОСОБЛИВОСТІ АЗОТИСТОГО СКЛАДУ БІОМАСИ МУКОРОВОГО ГРИБА *BLAKESLEA TRISPORA*

Л.О. Прімова, І.Ю. Висоцький

Медичний інститут Сумського державного університету, м. Суми

*У статті викладені результати досліджень азотистого складу біомаси каротинсинтезувального мукорового гриба *Blakeslea trispora*, яка отримана при культивуванні продуцента на експериментальному напівсинтетичному живильному середовищі. Встановлено, що біомаса відзначається низьким вмістом білків і надзвичайно високою концентрацією метіоніну. Відмічена незначна кількість фракцій небілкового азоту з переважанням нетоксичних його форм. Показано, що поряд з картопиною досліджувана біомаса може бути також джерелом незамінних амінокислот.*

ВСТУП

Одним із найбільш перспективних шляхів вирішення проблеми забезпечення людини і тварин біологічно активними речовинами – гормонами, ферментами, вітамінами, антибіотиками – є виробництво їх біотехнологічним шляхом [1, 2, 3, 4]. Мікроскопічний мукоровий гриб *Blakeslea trispora* є ефективним продуцентом каротину [5, 6, 7]. На основі природних штамів з низькою активністю шляхом комбінованого впливу на продуцента фізичних та хімічних мутагенів в Україні створені високоактивні, стабільні та технологічні штами гриба, які відрізняються якісним та кількісним складом каротиноїдів, розроблена технологія отримання кристалічного каротину, проводяться роботи щодо підвищення активності β -каротину і розробляються селекційні підходи для отримання перспективних каротиноїдів у складі *Blakeslea trispora* [8, 9, 10]. Для вирощування гриба використовують натуральні живильні середовища – відходи крохмале-патокового та олійного виробництв. Технологія виробництва каротину дозволяє отримати високоякісні продукти для медицини та харчової промисловості, а також каротиновмісні препарати для потреб сільськогосподарства, які містять каротин у концентраціях, що значно перевищують його кількість у будь-яких природних джерелах [11, 12].

Як гетеротрофні організми гриби використовують для пластичного та енергетичного обміну різноманітні органічні джерела азоту – білки, пептиди, амінокислоти, а також неорганічний азот аміаку, амонійних солей, нітратів, нітритів. Ступінь використання різних джерел азоту залежить від умов культивування, віку культури, спрямованості біосинтетичних процесів [8, 13, 14]. Застосування для вирощування каротинсинтезувального мукорового гриба *Blakeslea trispora*, безглюкозного живильного середовища, у якому неорганічні амонійні солі є єдиним джерелом азотного живлення, дозволяє здешевити та оптимізувати процес каротиногенезу та збільшити вихід каротину [15 – 18]. Проте відомо, що зміна складу середовища для культивування призводить до зміни синтезу вторинних метаболітів у міцеліальних грибів, що впливає на хімічний склад кінцевої біомаси і відповідно біотехнологічних продуктів, які виробляють на її основі [5, 15, 19].

У зв'язку з перспективою використання біомаси гриба *Blakeslea trispora*, яку виробляють за вдосконаленою технологією, як джерела каротину та враховуючи велику складність препаратів, що отримують за допомогою мікроорганізмів, виникає необхідність у більш детальному вивченні її хімічного і, зокрема, азотистого складу.

МЕТА РОБОТИ

Дослідити азотистий склад зразків біомаси мукорового гриба *Blakeslea trispora*, який культивували на експериментальному напівсинтетичному живильному середовищі: визначити концентрацію білка і його амінокислотний склад, вміст небілкового азоту та окремих його фракцій.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для дослідження азотистого складу було використано 8 зразків біомаси мукорового гриба *Blakeslea trispora*, який вирощували на напівсинтетичному живильному середовищі.

Вміст загального азоту у біомасі визначали за методом К'ельдаля (Держстандарт 13496.4-84) [20, 21]. Білковий азот виявляли методом Барнштейна. Концентрацію небілкового азоту обчислювали за різницею між загальним і білковим. Амонійний азот біомаси досліджували мікродифузним методом Конвея у безбілкових фільтратах зразків [22, 23]. Нітратний азот виявляли методом прямої потенціометрії за допомогою електродної системи приладу НМ-002, амідний азот – алкаліметричним методом, амінний азот – за різницею між сумою небілкового азоту й концентрацією різних його форм. Якісний і кількісний амінокислотний склад білків досліджуваної біомаси встановлювали у солянокислих гідролізатах сумарного білка методом іонообмінної хроматографії на високошвидкісному автоматичному амінокислотному аналізаторі моделі 835 виробництва фірми “Hitachi [24, 25, 26]. Результати обробляли статистично [26].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Азотисті речовини, що містяться у досліджуваних зразках, складають загальний азот – білковий і небілковий (табл. 1). У дослідженнях встановлено, що загальний азот біомаси дорівнює 1,6% сухої речовини. Кількість загального азоту і протеїну у міцелії гриба-продуцента незначна й перебуває на рівні середнього вмісту азоту в інших видах грибів [27].

Таблиця 1 – Вміст азотистих речовин у біомасі мукорового гриба *Blakeslea trispora*, г/кг натуральної маси

Показник	$x \pm S_x$	% у АСП
Суха речовина	939,5±6,9	100,0
Загальний азот (ЗА)	14,7±0,7	1,6
Протеїн (ЗА x 6,25)	89,4±4,3	9,5
Білковий азот (БА)	13,1±0,7	1,4
Білки (БА x 6,25)	81,9±4,3	8,7
Небілковий азот, у т. ч.: нітратний	1,2±0,1	0,13
амонійний	0,012±0,028	0,001
амідний	0,314±0,028	0,03
амінний	0,354±0,053	0,04
	0,512±0,046	0,05

За даними різних авторів, концентрація протеїну у раніше досліджуваних аналогічних препаратах становить 25,3-39,5% від маси

сухих речовин, тобто на 11,3-25,5% вище, ніж у зразках, що вивчалися [8, 28]. Такі відмінності у хімічному складі біомаси, вірогідно, зумовлені зміною напрямку біосинтетичних процесів у гриба у зв'язку з використанням живильного середовища з високим вмістом сульфату амонію як основного джерела азотного живлення та штамів гриба-продуцента, здатних до надсинтезу каротину [14]. У літературі є дані про хімічний склад каротиновмісних препаратів, однак усі вони стосуються продуктів, які отримували при культивуванні гриба-продуцента на натуральних живильних середовищах. Ці дані відрізняються у різних авторів, що, ймовірно, пов'язане зі здатністю гриба-продуцента синтезувати продукт, який варіює за хімічним складом залежно від умов культивування, а також із різноманітністю штамів *Blakeslea trispora*, які використовувалися [29, 30].

У грибах, як і в інших організмах, білковий азот є основною азотовмісною фракцією і становить 80-95% від загального азоту. Концентрація білків у деяких видів коливається у межах 6,5-47,4% [27, 28, 31]. Білковий азот біомаси становить 89,1% від загального азоту (табл. 1). Це досить високий відсоток порівняно із середнім вмістом білкового азоту у різних грибів. Концентрація білків у біомасі гриба *Blakeslea trispora* – 8,7%, що відповідає середньому вмісту їх у грибах. Відповідно до раніше опублікованих у літературі даних, аналогічні препарати каротину містять від 25 до 30% білка [28, 29]. Тобто досліджувана біомаса відрізняється низьким вмістом білків – на 15,5-25,5% менше, ніж у КПМК, що, можливо, пов'язане зі зміною джерел азотного живлення.

Амінокислотний склад міцелію грибів варіює залежно від виду та здатності до поглинання окремих амінокислот [27, 31]. Склад культурального середовища та його рН, умови культивування, вік культури, фази росту гриба впливають на спрямованість біосинтезу амінокислот. Проведені дослідження зразків біомаси гриба *Blakeslea trispora* встановили наявність у них 17 протеїногенних амінокислот, 9 з яких незамінні – треонін, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, фенілаланін, лізин, гістидин, аргінін і 8 замінні – аспарагінова й глутамінова кислоти, серин, аланін, цистин, тирозин, пролін, гліцин (рис. 1). Триптофан під час кислотного гідролізу руйнується [32].

Незвичайною особливістю біомаси є високий вміст метіоніну. Концентрація цієї амінокислоти перевищує кількість її у всіх досліджених до цього часу природних джерелах (табл. 2) [33]. Майже кожен третій амінокислотний залишок у досліджуваних зразках представлений метіоніном, тобто 32,42%, який у більшості білків є лімітуючою амінокислотою. Можливо, що високий вміст його у зразках обумовлений наявністю в середовищі для культивування гриба значної кількості сульфатів (амонію, заліза, цинку та ін.). Відомо, що гриби здатні використовувати органічні та неорганічні джерела сірки для росту міцелію, утворення репродуктивних органів, споруляції, синтезу різноманітних вторинних метаболітів, до яких належать і амінокислоти. Більшість грибів добре засвоює сірку сульфатів. Наявність у середовищі сульфату амонію позитивно впливає на ріст більшості грибів [14]. Наявність різноманітних сульфатів у культуральному середовищі, вірогідно, сприяла більш повній реалізації біосинтетичних можливостей гриба.

У вивчених літературних джерелах свідчення про вміст метіоніну у складі КПМК та інших препаратах, які отримували на основі біомаси мукорового гриба *Blakeslea trispora*, поодинокі (2,1%) або не наведені [29].

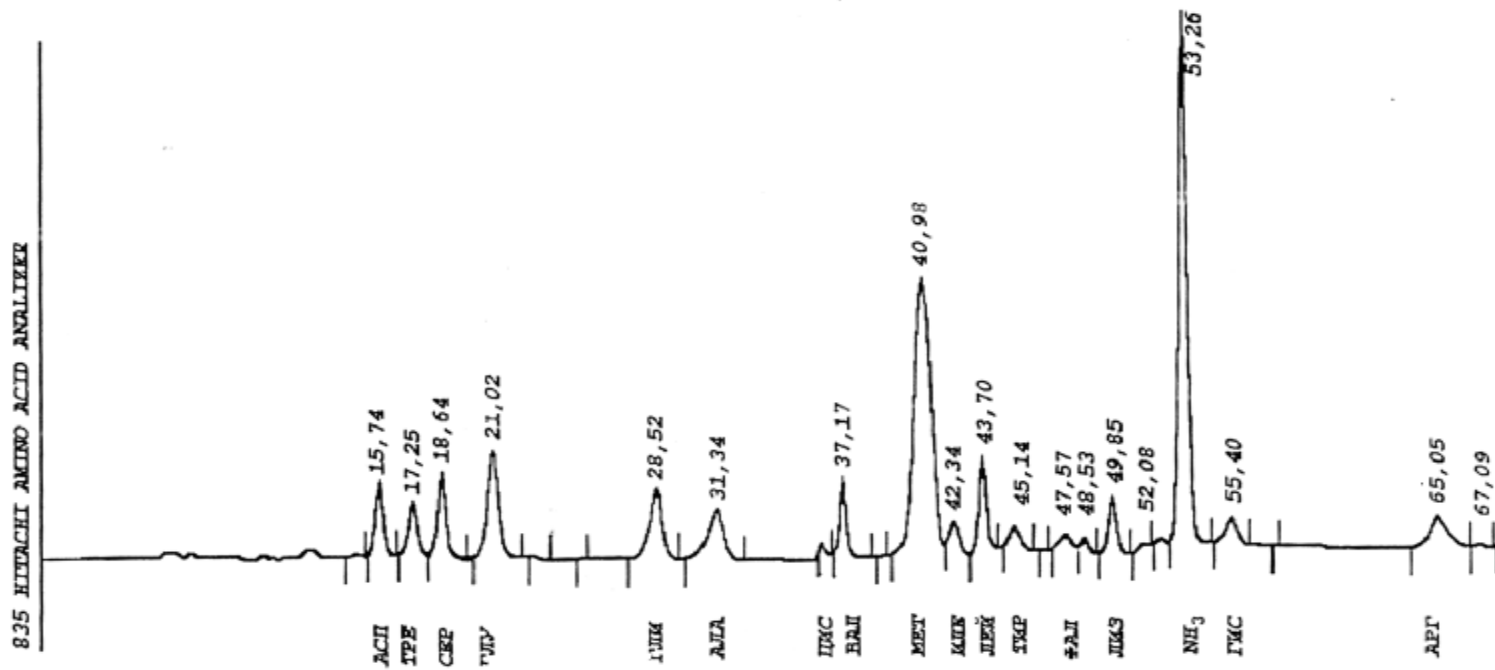


Рисунок 1 – Хроматограма амінокислотного складу білків біомаси гриба *Blakeslea trispora*

Серед інших амінокислот у досліджуваних зразках біомаси у найбільших кількостях наявні глютамінова кислота, аспарагінова кислота, лейцин; найменше – фенілаланіну, ізолейцину, гістидину, тирозину. Концентрації інших амінокислот мають середні значення. Сума незамінних амінокислот у біомасі перевищує суму замінних. Амінокислотний індекс (відношення незамінних амінокислот до замінних) як показник біологічної цінності білків становить 1,46, що свідчить про їх високу якість. Слід зазначити, що концентрації інших амінокислот, за винятком метіоніну, фенілаланіну, лізину, гістидину, аргініну, у досліджуваних зразках біомаси близькі до раніше опублікованих літературних даних (табл. 2) [29].

Таблиця 2 – Амінокислотний склад білків біомаси гриба *Blakeslea trispora*

Амінокислота	г/кг натуральної маси	Відсоток у протеїні	
		біомаса	КПМК [30]
Аспарагінова кислота	5,80±0,04	5,59	7,72
Треонін	3,74±0,01	3,61	3,34
Серин	4,70±0,05	4,53	3,15
Глутамінова кислота	11,88±0,03	11,46	10,20
Гліцин	3,90±0,01	3,76	3,18
Аланін	4,20±0,01	4,05	4,35
Валін	3,86±0,02	3,72	3,83
Метіонін	32,62±0,88	32,42	*
Ізолейцин	2,18±0,04	2,10	3,38
Лейцин	5,98±0,05	5,77	5,03
Тирозин	2,67±0,01	2,57	5,94
Фенілаланін	1,78±0,01	1,72	2,63
Цистеїн	Сліди	-	*
Лізін	3,33±0,01	3,21	4,05
Аміак	4,27±0,03	4,12	*
Гістидин	2,24±0,02	2,16	1,62
Аргінін	4,84±0,11	4,65	3,21
Пролін	4,70±0,10	4,53	*
Сума амінокислот, у т.ч. незамінних і замінних	103,7 61,6 42,1	99,97 59,29 40,69	64,32 27,07 37,25
*Результати не наведені			

Крім білкового азоту, у клітинах і тканинах живих організмів містяться азотисті сполуки небілкової природи: нітрати, аміак, вільні амінокислоти, аміни, аміді, вітаміни, вільні нуклеотиди та ін., які становлять фракцію небілкового азоту. У літературі не виявлено відомостей про вміст фракцій небілкового азоту у біомасі гриба *Blakeslea trispora* та у препаратах, які виробляють на її основі.

За результатами проведених досліджень встановлено, що небілковий азот у зразках, які вивчалися, становить 0,13% від суми сухих речовин і 8,1% від загального азоту (табл.1).

Нітратний азот є винятково рухомою водорозчинною фракцією. Надходячи в організм грибів, нітрати відновлюються до нітритів за участі ферменту *нітратредуктази* і далі через ряд послідовних перетворень – до аміаку, який може використовуватися у синтезі амінокислот. Нітратредуктаза індукується за наявності нітратів у середовищі та, навпаки, амонійний азот як кінцевий продукт дії ензиму інгібує її.

Blakeslea trispora відносять до групи грибів, які погано засвоюють азот нітратів. Середовище для культивування гриба не містить спеціально внесених нітратів, до його складу вони можуть потрапляти у незначній кількості з компонентами середовища, частина їх може утворюватися під час окиснювання аміаку до нітратів. Серед інших форм небілкового азоту біомаси гриба Blakeslea trispora нітратний становить невелику частку – не більше 1% (табл. 1). Кількість нітратів у досліджених зразках нижча припустимих норм, які встановлено для рослин, – 10-500 мг/кг [20, 34].

Амонійний азот, зокрема солі амонію, є істотним джерелом азотного живлення для більшості грибів. Деякі види здатні засвоювати навіть газоподібний аміак, який утилізується у реакціях прямого амінування - кетокислот з утворенням амінокислот. Крім того, у багатьох грибів виявлені *дегідратази*, що каталізують реакції неокиснювального дезамінування амінокислот і продукують аміак та відповідні кетокислоти для біосинтетичних та енергетичних потреб клітини.

Амонійний азот у біомасі гриба Blakeslea trispora становить 2,1% від загального азоту. Частка цієї фракції у складі небілкового азоту зразків становить 26,2%.

Порівняно з “кислими” рослинами, які можуть накопичувати до 1,32г аміачного азоту на 1кг сухої маси, вміст амонійного азоту у біомасі досить низький.

Амідний азот є одним з найкращих джерел азоту для грибів. Він утворюється у результаті утилізації екзогенного (з середовища) та ендогенного аміаку, який вивільняється у результаті процесів дезамінування, і представлений амідами амінокислот та органічних кислот. У грибів особливе місце в обміні аміаку відіграє сечовина, функції якої аналогічні до функцій аспарагіну й глутаміну у тварин [27]. Амідний азот у біомасі гриба Blakeslea trispora становить 29,5% від вмісту небілкового азоту (табл.1).

Амінний азот включає вільні амінокислоти, аміни, аміногрупи вільних нуклеотидів, деяких вітамінів та ін. Більша частина – це амінокислоти, які вносять у живильне середовище для вирощування гриба Blakeslea trispora у складі кукурудзяного екстракту, а також синтезуються грибом. Частка амінного азоту у біомасі гриба Blakeslea trispora найбільша і дорівнює 42,7% від небілкового азоту (табл.1). Як правило швидкість поглинання амінокислот грибами з середовища вища, ніж швидкість включення їх у білки. У клітинах створюється пул, або резерв вільних амінокислот, який забезпечує біосинтетичні потреби організму. Склад цього пулу може змінюватися залежно від фізіологічного стану гриба та умов культивування.

Таким чином, проведені дослідження біомаси мукорового гриба Blakeslea trispora, який вирощували на напівсинтетичному живильному середовищі, свідчать про відмінність його азотистого складу від аналогічних препаратів, що вивчалися раніше, зокрема, низькою кількістю білків, надзвичайно високою концентрацією метіоніну. Визначення вмісту залишкового азоту у зразках показало, що концентрація його не перевищує 0,13% при незначній кількості нітратного та амонійного і більш високому вмісті амідного та амінного азоту.

ВИСНОВКИ

1 Встановлено, що біомаса каротинсинтезувального гриба Blakeslea trispora містить незначну кількість білка, що включає всі протеїногенні амінокислоти. Особливістю її є висока концентрація метіоніну, і при відповідних концентраціях вона може бути джерелом незамінних амінокислот.

2 Визначено, що небілковий азот становить менше 1% і на 72% представлений аміним і амідним при незначній кількості небажаних його форм – нітратного й амонійного.

3 Результати проведених досліджень характеризують азотистий склад біомаси гриба *Blakeslea trispora*, а також поповнюють банк даних про хімічний склад міцеліальних грибів і можуть бути використані при розробленні рекомендацій щодо використання біомаси, а також для обґрунтування напрямків удосконалення існуючих і розроблення нових технологій виробництва біотехнологічних препаратів на основі гриба *Blakeslea trispora*.

SUMMARY

FEATURES OF NITROGENOUS COMPOSITION OF A BIOMASS OF MUCORALES FUNGUS BLAKESLEA TRISPORA

L.A. Primova, I.Yu. Vysotsky
Sumy State University

Results of researches of nitrogenous composition of a biomass of carotene-synthesizing mucorales fungus Blakeslea trispora which is received under cultivation of a producent on experimental semisynthetic nutrient medium are stated in the article. It is established, that the biomass differs the low contents of proteins and unusually high concentration of methionine. The insignificant amount of fractions of nonproteinous nitrogen with prevalence of nontoxic forms is marked. It is shown, that alongside with the carotene, the researched biomass can also be a source of essential amino acids.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ларичева Е., Архипов А., Нецаева С., Шаповалов Д. Препарат из сине-зеленых водорослей // Птицеводство.-1995.- № 6.- С.17-18.
2. Pandey U., Pandey J. Enhanced production of biomass, pigments and antioxidant capacity of a nutritionally important cyanobacterium *Nostochopsis lobatus* // Bioresource Technology. – 2008. – Vol. 99 (10). – P. 4520-4523.
3. Rodriguez-Villalon A., Perez-Gil J., Rodriguez-Concepcion M. Carotenoid accumulation in bacteria with enhanced supply of isoprenoid precursors by upregulation of exogenous or endogenous pathways // J. Biotechnol. – 2008. – Vol. 135 (1). – P. 78-84.
4. Стенько А.С., Мартиновський В.П., Кунщикова Є.А., Кунщикова І.С. Мікроорганізми – продуценти β-каротину природного походження // Міжнародна конф. “Використання каротиноїдів мікробного походження в агропромисловому комплексі” (Суми, 2-4 жовтня 2002 р.): Тез.доп. – Суми, 2002., – С.19-21.
5. Böhme K., Richter C., Pätz R. New insights into mechanisms of growth and beta-carotene production in *Blakeslea trispora* // Biotechnol. J. – 2006. – Vol. 1 (10). – P. 1080-1084.
6. Kuzina V., Cerdá-Olmedo E. Ubiquinone and carotene production in the Mucorales *Blakeslea* and *Phycomyces* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 76 (5). – P. 991-999.
7. Feofilova E.P. Heterothallism of mucoraceous molds: a review of biological implications and uses in biotechnology // Prikl. Biokhim. Mikrobiol. – 2006. – Vol. 42 (5). – P. 501-519.
8. Санникова В.М., Погуляка В.Д., Санников Ф.П., Тюпа Г.Г. Разработка питательной среды для выращивания гриба – продуцента каротина // Биотехнология.-1989. – Т. 5, №1. – С.58-60.
9. Mehta B.J, Obratsova I.N., Cerdá-Olmedo E. Mutants and intersexual heterokaryons of *Blakeslea trispora* for production of beta-carotene and lycopene // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69 (7). – P. 4043-4048.
10. Choudhari S.M., Ananthanarayan L., Singhal R.S. Use of metabolic stimulators and inhibitors for enhanced production of beta-carotene and lycopene by *Blakeslea trispora* // Bioresour. Technol. – 2008. – Vol. 99 (8). – P. 3166-3173.
11. Avchieva P.B., Tyurenkov V.A., Butorova I.A., Deev S.V., Avchiev M.I., Kulakova A.V., Durnev A.D. Antimutagenic activity of lipidovit // Bull. Exp. Biol. Med. – 2004. – Vol. 137 (3). – P. 266-269.
12. Lypez-Nieto M.J., Costa J., Peiro E., Múndez E., Rodríguez-Sóiz M., de la Fuente J.L., Cabri W., Barredo J.L. Biotechnological lycopene production by mated fermentation of *Blakeslea trispora* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2004. – Vol. 66 (2). – P. 153-159.
13. Васильченко С.А., Баталкіна Л.В. Вплив вуглеводів на екзоліпазну активність каротинсинтезуючого гриба *Blakeslea trispora* // Біотехнологічні дослідження і перспективи їх розвитку. – Львів, 1990.-С.75.

14. Васильченко С.А., Шкляр Г.Д., Орехов В.С. Использование методов регрессивного и булевого анализа при изучении влияния растительных масел на каротиногенез *Blakeslea trispora* // Биотехнология.-1992.-№2.-С.26.
15. Mantzouridou F., Roukasa T., Kotzekidou P., Liakopoulou M. Optimization of beta-carotene production from synthetic medium by *Blakeslea trispora*: a mathematical modeling // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2002. – Vol. 101 (2). – P. 153-175.
16. Choudhari S., Singhal R. Media optimization for the production of beta-carotene by *Blakeslea trispora*: a statistical approach // Bioresour. Technol. – 2008. – Vol. 99 (4). – P. 722-730.
17. Васильченко С.А., Орехов В.С., Федорова И.С. Изучение и оптимизация периодического процесса микробного синтеза β -каротина на основе булево-вероятностного подхода // Биотехнология. – 1991.– №4. – С.79-81.
18. Гаврилов А.С., Ивакин А.Ф., Грачева И.М. Влияние концентрации неорганического фосфата в среде на биосинтез каротина грибом *Blakeslea trispora*. – М.: Технологический институт пищевой промышленности, 1989. -19 с.
19. Mantzouridou F., Naziri E., Tsimidou M.Z. Industrial glycerol as a supplementary carbon source in the production of beta-carotene by *Blakeslea trispora* // J. Agric. Food Chem. - 2008. – Vol. 56 (8). – P. 2668-2675.
20. Дерягина В.П., Жукова Г.Ф., Хотимченко С.А. Содержание в продуктах питания нитратов и нитритов и оценка их поступления с суточным рационом // Вопр. питания.-1993. – №4. – С.47-52.
21. Сурай П.Ф., Ионов И.А. Методы анализа кормов и продуктов птицеводства. – Харьков, 1984. – С.95.
22. Петухова Е.А., Бесарабова Р.Ф., Холенева Л.Д., Антонова О.А. Зоотехнический анализ кормов.- М.: Агропромиздат, 1989.-239 с.
23. Perrin C.H. Rapid modified procedure for determination of Kjeldahl nitrogen // Anal. Chem.-1953. – V.25. – P.968-971.
24. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии / Под ред. А.Хеншен. – М.: Мир, 1988. – 688с.
25. Рядчиков В.Г., Андропова И.Н., Дрозенко Н.П., Птак И.Р. Методы определения аминокислот в кормах, животноводческой продукции и продуктах обмена /Под ред. М.Ф.Томмэ. – Дубровица, 1967.-84 с.
26. Иванов Ю.И., Погорелюк О.Н. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам. – М.: Медицина, 1990.– 224 с.
27. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов. – М.: МГУ, 1988. – 229 с.
28. Квасников Е.И., Щелоква И.Ф. Дрожжи. Биология. Пути использования. – К.: Наукова думка, 1991.-328 с.
29. Бобнева С.М. Биомасса гриба *Blakeslea trispora* – источник каротина, белка и липидов //Сб. Использование биомассы микроорганизмов для пищевых целей. – Пущино, 1985.-С.61-72.
30. Фисинин В.И., Околелова Т.М., Егоров И.А., Лобин Н.В. К вопросу об использовании продуктов микробиологического синтеза в птицеводстве //В сб. Совершенствование кормления с.-х. птицы. – М.: Колос, 1982. – С.140-147.
31. Олешко В.С., Бабицкая В.Г. Аминокислотный и фракционный состав белков грибного происхождения //Микробиология и фитопатология.-1991.-25,№3.-С.223-239.
32. Прімова Л.О., Кіндя В.І. Амінокислотний склад білків вітатону та вітадепсу // Вісник Сумського державного аграрного університету. Використання каротиноїдів мікробного походження в агропромисловому комплексі: Матеріали міжнародної наукової конференції. – Суми, 2002.- С.15 – 19.
33. Томмэ М.Ф., Мартыненко Р.В. Аминокислотный состав кормов. – М.: Колос, 1972.
34. Лешков П.П. Нитраты и качество продуктов растениеводства. – Новосибирск: Наука, 1991.

Прімова Л.О., канд. біол. наук,
 Медичний інститут СумДУ, м. Суми;
Висоцький І.Ю., д-р. мед. наук,
 Медичний інститут СумДУ, м. Суми.

Надійшла до редакції 7 липня 2008 р.