

УДК: 582.284+282

КОЛЕКЦІЯ КУЛЬТУР ШАПИНКОВИХ ГРИБІВ – ОСНОВА МІКОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА СТРАТЕГІЇ ЗБЕРЕЖЕННЯ БІОРІЗНОМАНІТТЯ БАЗИДІОМЦЕТІВ

О. В. Федотов, О. В. Чайка, Т. Є. Волошко, А. К. Велигодська

Робота присвячена створенню колекції культур базидіальних грибів (відділ *Basidiomycota*) для дослідження прооксидантно-антиоксидантної системи грибів. З цією метою використано методи тканинних ізолятів, а також ідентифікації та аналізу систематичної приналежності за макро- і мікроскопічними ознаками карпофорів і соматичних культур. Отримано 125 штамів, що належать до 23 видів 18 родів базидіоміцетів, з яких 27 штамів відносяться до порядку *Polyporales* (поліпорові або афілофорові) і 98 – до порядку *Agaricales* (агарикові).

Ключові слова: колекція культур, базидіоміцети, прооксидантно-антиоксидантна система.

Вступ. Значний інтерес багатьох спеціалістів до вивчення базидіоміцетів пояснюється корінними змінами поглядів на положення грибів в системі живого світу та можливостями їх широкого практичного використання [1, 2]. Це зумовило більш глибоке вивчення процесів їх метаболізму, розробку і удосконалення технічного оснащення процесів культивування, створення колекцій чистих культур [3 – 6].

Виготовлення препаратів на основі біологічно активних речовин (БАР) природного походження (*natural product-based drug discovery* – NPDD) в різних країнах світу конкурує з продуктами хімічного синтезу та трансгенними організмами-продуцентами БАР. Аналіз активності NPDD показав, що серед досліджених мікроорганізмів найбільш широко були представлені грибні організми із таких таксонів і екологічних груп, як аскоміцети, мітоспорові, ґрунтові, дереворуйнівні і гриби, що мешкають на лісовій підстилці. При цьому компанії стикнулися з труднощами отримання біологічного матеріалу для пошуку перспективних штамів із різних країн світу в силу дії Конвенції з біорізноманіття. Залучення в орбіту досліджень грибних організмів зі складною трофікою і екологією, які рідко зустрічаються, не тільки дозволить розширити пошук, але і буде сприяти отриманню нової інформації з їх біології, біохімії і генетики [7]. Зокрема, вивчення біосинтетичної активності базидіоміцетів, їх низькомолекулярних і полімерних метаболітів призвело до відкриття різноманітних структур природних сполук, в тому числі і специфічних антиокисних речовин та ферментів, які значно поповнили асортимент біологічно активних речовин. Існують два взаємопов'язані напрями роботи зі збереження біорізноманіття грибів – *in situ* та *ex situ* [8]. І.О. Дудка і співавтори відмічають, що важливим і найбільш гарантованим прийомом збереження біорізноманіття є *in situ* – система природно-заповідного фонду (ПЗФ), фундаментом якої є заповідники та національні природні парки. На території об'єктів ПЗФ зберігається близько 75% усього біорізноманіття України [9]. На жаль, заповідники і національні природні парки створені не в усіх біогеографічних областях, до того ж вони розміщені на території України нерівномірно. Найбільші площі охоронюваних територій в Україні (5-14%) приурочені в основному до Правобережжя, його західних і північно-західних областей, де природна рослинність зазнала меншого антропогенного впливу, де менший відсоток розораних земель, збереглися великі лісові масиви. Інша ситуація спостерігається на Лівобережжі, де розорано близько 70-80% площ. Через надмірну експлуатацію природних ресурсів та інтенсивний розвиток промисловості значно скоротилося біорізноманіття деяких з регіонів (Донецького, Придніпровського, Запорізького-Дніпродержжинського) [9]. Отже, збереження біорізноманіття на території Лівобережної України має особливе значення. Важливим шляхом збереження генофонду рідкісних та зникаючих видів і загалом біорізноманіття грибів є *ex situ* – введення в штучну культуру та збереження їх у колекціях живих культур, що мають бути базою як для теперішніх, так і наступних мікологічних досліджень базидіоміцетів, зокрема, як об'єктів біотехнології [1, 5, 10].

Мета дослідження – створення колекції культур базидіальних грибів для вивчення їх прооксидантно-антиоксидантної системи, розробки і удосконалення методів виділення та культивування, оптимізації складу живильних середовищ та умов росту і зберігання, ініціації плодоношення.

Матеріали і методи. Об'єкт дослідження – колекція культур базидіоміцетів, що нараховує 125 штамів. Культури підтримуються при $+20\pm 5^\circ\text{C}$ на агаризованому пивному суслі (4° за Баллінгом) і пересіваються з перевіркою чистоти кожні 5-6 місяців. Виділення культур здійснювали за загальноновизнаними методами [4], із тканини плодових тіл – карпофорів. Збір плодових тіл в природі проводили в період їх масового появи, в суху погоду. Для виділення культури відбирали молоді, неушкоджені плодові тіла, найменше інфіковані мікроорганізмами. Свіжозібрані зразки карпофорів попередньо звільняли від залишків ґрунту, листя та поміщали у чисті паперові конверти із зазначенням дати, місця збору і субстрату зростання гриба. Виділення, як правило, проводили в день збору. Зберігали плодові тіла для досліджень чи повторного виділення протягом 2-3 діб в холодильнику при $6\pm 2^\circ\text{C}$.

У разі появи контамінантів, колонії базидіоміцетів послідовно пересівали з обов'язковим наступ-

ним мікроскопічним контролем. Від сторонньої флори позбавлялися за допомогою звичайних методів мікробіологічної техніки [4]. Для пригнічення росту бактерій, які забруднюють грибні культури, при виділенні використовували підкислений агар (рН 4,5-5,0) або антибіотики.

Результати та обговорення. На кафедрі фізіології рослин біологічного факультету Донецького національного університету для дослідження прооксидантно-антиоксидантної системи грибів, створено колекцію культур базидіальних грибів (відділ *Basidiomycota*). На сьогодні колекція налічує 125 штамів, що належать до 23 видів 18 родів базидіоміцетів. Серед цих культур 27 штамів належать до порядку *Polyporales* (поліпорові або афілофорові) та 98 – до порядку *Agaricales* (агарикові). Переважна більшість інтродукованих штамів (88%) виділена в чисту культуру з дикоростучих плодових тіл (ДПТ) грибів, зібраних на природних субстратах в різних місцевостях Донецької області.

В табл. 1. наведено наступні відомості: загальний список штамів та їх видова приналежність, джерело надходження: місце збору ДПТ, з яких інтродуковані відповідні культури або колекції чи комерційні організації, з яких отримані штами для досліджень, рік інтродукції та наявність у колекції культур кафедри фізіології рослин (КФР) чи ІВК. Відомості про систематичне положення культур грибів розглядаються згідно сучасних літературних джерел [11].

Таблиця 1

Список штамів, що складають колекцію культур базидіоміцетів кафедри фізіології рослин, задіяних у вивченні прооксидантно-антиоксидантної системи грибів

Вид	Шифр штаму	Джерело надходження *	Рік інтродукції	Наявність у колекції
1	2	3	4	5
Порядок <i>Polyporales</i>				
<i>Amyloporia lenis</i> (Karst.) Bond. et Sing.	A-004	НПП „СГ”	1994	ІВК
<i>Daedalea quercina</i> Fr.	T-352	КЛ	1995	ІВК
	Dq-08	КЛ	2008	КФР, ІВК
<i>Fomes fomentarius</i> (L. ex Fr.) Gill.	Ff-09	Дн	2009	КФР
	T-10	Дн	2010	КФР
	Ff-1201	ІФ	2012	КФР
<i>Fomitopsis pinicola</i> (Schwein.: Fr.) P. Karst.	TO-09	ДБС	1991	ІВК
<i>Ganoderma lucidum</i> (Curt.: Fr.) P. Karst.	G1-1	Сн	2008	КФР, ІВК
	G1-2	Сн	2008	КФР, ІВК
	G1-3	Сн	2008	КФР, ІВК
	G1-B-99	Сн	1999	КФР
	G1-11	Сн	2011	КФР
<i>Grifola frondosa</i> (Dicks.) Gray	Gf-01	КЛ	2008	КФР
<i>Irpex lacteus</i> Fr.	B-059	Дн	1991	ІВК
	A-032	Дн	1991	ІВК
	II-4k	Дн	2004	КФР
	II-1	Дн	2011	КФР
	II-1201	Дн	2012	КФР
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murrill	Лs-08	КЛ	2008	КФР
	Лs-09	КЛ	2009	КФР
	Лs-11	Дн	2011	КФР
<i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Lloyd	Th-11	Дн	2011	КФР
<i>Trametes ochracea</i> (Pers.) Gilb. & Ryvarden	TO-1201	Дн	2012	КФР
<i>Trametes trogii</i> Berk.	Tt-11	Дн	2011	КФР
<i>Trichaptum bifforme</i> (Fr.) Ryvarden	Tb-11	Дн	2011	КФР
<i>Tyromyces revolutus</i> (Bres.) Bond, et Sing.	A-025	Дн	1995	ІВК
<i>Tyromyces undosus</i> (Peck) Murr.	M-250	Дн	1995	ІВК
Порядок <i>Agaricales</i>				
<i>Agrocybe aegerita</i> Fayod.	167	ІВК	2009	КФР, ІВК
	218	ІВК	2009	КФР, ІВК
	960	ІВК	2009	КФР, ІВК
<i>Fistulina hepatica</i> Schff. ex Fr.	Fh-08	КЛ	2008	КФР, ІВК
	Fh-18	КЛ	2008	КФР, ІВК
<i>Flammulina velutipes</i> (Curt.: Fr.) Sing.	F-03	ДБС	2002	КФР, ІВК
	F-04	ДБС	2002	ІВК
	F-06	ДБС	2002	КФР, ІВК
	F-073	ДБС	2002	КФР, ІВК
	F-074	ДБС	2002	ІВК
	F-1	Дн	1998	КФР, ІВК
	F-10	Дн	2010	КФР
	F-101	Дн	2009	ІВК

Продовження табл. 1

1	2	3	4	5
<i>Flammulina velutipes</i> (Curt.: Fr.) Sing.	F-102	НПП „СГ”	2002	КФР, ІВК
	F-103	ДБС	2010	ІВК
	F-104	НПП „СГ”	2004	КФР, ІВК
	F-107	НПП „СГ”	2004	КФР, ІВК
	F-11	Дн	2011	КФР
	F-112	НПП „СГ”	2002	КФР
	F-1v	Дн	2009	ІВК
	F-2	Дн	2009	КФР, ІВК
	F-201	Дн	2003	ІВК
	F-202	Дн	2003	КФР, ІВК
	F-203	Дн	2003	ІВК
	F-204	Дн	2003	КФР
	F-3	Дн	1998	ІВК
	F-v ₁	Дн	2001	ІВК
	F-vv	Дн	2002	КФР, ІВК
F-610	ІВК	2003	ІВК	
F-1105	Дн	2012	КФР	
<i>Lentinus edodes</i> (Berk.) Singer	Le-10	Китай	2009	КФР, ІВК
	Le-2	Китай	2009	КФР, ІВК
	Le-340	ІВК	2001	КФР, ІВК
	Le-4	Китай	2009	КФР, ІВК
	Le-5	Китай	2008	ІВК
	Le-6	Китай	2008	КФР, ІВК
	Le-7	Китай	2008	КФР, ІВК
Le-9	Китай	2009	ІВК	
<i>Lepiota cristata</i> (Bolton) P. Kumm.	1	Дн	2010	ІВК
	2	Дн	2010	ІВК
	3	Дн	2010	ІВК
	4	Дн	2010	ІВК
<i>Pleurotus citrinopileatus</i> Singer.	P-citr.	УкрМ	1997	КФР
<i>Pleurotus eryngii</i> (DC.: Fr.) Quéf.	P-er	УкрМ	1997	КФР
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.: Fr.) P. Kumm.	D-140	Дн	2001	КФР, ІВК
	Нк-35	Угорщина	2004	КФР
	P-004	Дн	2004	КФР, ІВК
	P-008	Дн	2008	ІВК
	P-01	Дн	2001	КФР, ІВК
	P-011	Дн	2003	ІВК
	P-035	Дн	1995	КФР, ІВК
	P-038	Дн	1999	ІВК
	P-039	Дн	1999	КФР, ІВК
	P-081	ДБС	1998	КФР, ІВК
	P-082	ДБС	1998	КФР, ІВК
	P-083	ДБС	1998	КФР, ІВК
	P-087	ДБС	1998	КФР, ІВК
	P-088	ДБС	1998	КФР, ІВК
	P-089	ДБС	1998	КФР, ІВК
	P-105	Сл	2004	КФР, ІВК
	P-106	Сл	2004	ІВК
	P-107	Сл	2007	КФР, ІВК
	P-108	Сл	2008	ІВК
	P-12	НПП „СГ”	2002	ІВК
	P-12к	НПП „СГ”	2002	КФР, ІВК
	P-175	Сл	2005	ІВК
	P-191	КЛ	2007	КФР, ІВК
	P-192	КЛ	2007	КФР, ІВК
	P-200	Дн	2000	ІВК
	P-202	Дн	2003	ІВК
	P-203	Дн	2003	КФР, ІВК
P-204	Дн	2004	ІВК	
P-206	Дн	1997	КФР, ІВК	
P-208	Дн	2006	КФР, ІВК	
P-209	Дн	2006	КФР	

Продовження табл. 1

1	2	3	4	5
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.: Fr.) P. Kumm.	P-210	НПП „СГ”	2007	КФР, ІВК
	P-217	НПП „СГ”	2007	ІВК
	P-47	НПП „СГ”	2007	ІВК
	P-6	Дн	2006	ІВК
	P-6v	Дн	2006	КФР, ІВК
	P-кл	Дн	2007	КФР, ІВК
	P-14	НПП „СГ”	2002	ІВК
	P-2к	Дн	2010	ІВК
	P-4к	Дн	2010	КФР
	P-4	Дн	2010	ІВК
	P-7	Дн	2010	ІВК
	P-90	Дн	2009	ІВК
	P-91	Дн	2009	КФР, ІВК
	P-93	Дн	2009	ІВК
	P-94	Дн	2009	КФР, ІВК
P-998	Дн	2008	КФР	
P-447	Дн	2011	КФР	
P-2175	Дн	2011	КФР	
<i>Schizophyllum commune</i> Fr.: Fr.	Sc-10	Дн	2010	ІВК
	Sc-1101	Дн	2011	КФР
	Sc-1102	Дн	2011	КФР
	Sc-1104	Дн	2011	КФР
	Sc-201	НПП „СГ”	2001	ІВК

Примітка: “ * ” – вказані скорочені назви місць збору ДПТ, з яких інтродуковані відповідні культури або колекції чи комерційні організації, з яких отримані штами: ДБС – Донецький ботанічний сад НАН України; Дн – м. Донецьк; ІВК – шифр Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України; ІФ – м. Івано-Франківськ; КЛ – Красноліманське лісництво; НПП «СГ» – національний природний парк “Святі гори”; СЛ – Словолянське лісництво; Сн – м. Сніжне; УкрМ – ТОВ „Укрміцелій”.

Аналіз колекції штамів говорить про те, що всі вони є ксилотрофами, 74,4% із яких є їстівними, 25,6% – неїстівними, 85,6% – лікарськими [12]. Значна частина – 96 штамів або 87,3% від інтродукованих нами в культуру базидіоміцетів депоновано у Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІВК), що має статус Національного надбання України [6].

Створена колекція, перш за все, використовується з науково-дослідницькою метою для вивчення прооксидантно-антиоксидантної системи грибів: антиоксидантної, каталазної, пероксидазної, супероксиддисмутазної активності, процесів перекисного окиснення ліпідів, вмісту поліфенольних речовин і пігментів – каротиноїдів, меланінів. Також вона задіяна для розробки і удосконалення методів виділення та культивування штамів, оптимізації складу живильних середовищ та умов росту і зберігання культур, ініціації плодоношення. Отже, створено засади можливого біотехнологічного використання антиоксидантних властивостей базидіоміцетів в різних галузях промисловості, сільського господарства, фармакогнозії та біоіндикації. Отримані нові експериментальні дані з біології базидіоміцетів: їх антиоксидантної, супероксиддисмутазної, каталазної і пероксидазної активності, рівня перекисного окиснення ліпідів та вмісту поліфенолів і пігментів. Розроблені нові способи індукції біосинтетичної активності та живильні середовища для виділення та культивування базидіоміцетів [13-18].

Отримані штами та експериментальні дані використовуються в навчальному процесі на біологічному факультеті ДонНУ при викладанні навчальних курсів „Лікарські речовини рослин і грибів” [7], „Новітні технології біоіндикації та екологічні проблеми Донбасу”, “Сучасні проблеми біології”, “Основи грибовництва” та виконанні курсових, дипломних і магістерських робіт. Зокрема, для апробації можливостей використання різноманітних макроміцетів в якості об’єктів культивування, продуцентів біологічно активних речовин, для отримання плодівих тіл, мікоіндикації тощо.

Висновок. Таким чином, створена колекція культур базидіальних грибів, що налічує 125 штамів відповідає поставленій меті – дослідження їх прооксидантно-антиоксидантної системи. Вона також є фактором збереження біорізноманіття макроміцетів унікального урбанізованого довкілля Донецького регіону. Винятковість цієї мікобіоти пояснюється загальнобіологічною закономірністю про те, що будь-який організм під час впливу на нього факторів зовнішнього середовища чи при освоєнні нової еконіші або є резистентним, або, як правило, адаптується. Це реалізується шляхом набуття нових властивостей і зміни норм реакції, що досягається за рахунок варіабельності онтогенетичних і фізіологічних властивостей. Ці адаптаційні перебудови, скоріше за все ведуть і до формування мікобіоти урбанізованих систем цих територій, що стала основою створеної колекції культур базидіоміцетів.

РЕЗЮМЕ

Робота посвящена створенню колекції культур базидіальних грибів (віддел *Basidiomycota*) для дослідження прооксидантно-антиоксидантної системи грибів. С цією метою використані методи тканинних ізолятів, а також ідентифікації та аналізу систематичної належності за макро- та мікроскопічними ознаками карпофорів та соматических культур. Отримано 125 штамів, належних до 23 видів 18 родів базидіоміцетів, з яких 27 штамів належать до порядку *Polyporales* (поліпорові або афіллофорові) та 98 – до порядку *Agaricales* (агарикові).

Ключові слова: колекція культур, базидіоміцети, прооксидантно-антиоксидантна система.

SUMMARY

The goal of the investigation is forming the basidiomycetes fungi culture collection (phylum *Basidiomycota*) as the base of researching the prooxidant-antioxidant system of fungi. Methods of tissue isolates as well as identification and analysis of the systematic affiliation by the macro- and microscopic characteristics of carpophores and culture mycelium were used for this purpose. The obtained collection includes 125 strains belonging to 23 species of 18 genera of basidiomycetes. 27 strains belong to the order *Polyporales* and 98 belong to the order *Agaricales* among these cultures.

Keywords: collection of cultures, basidiomycetes, prooxidant-antioxidant system.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гарибова Л.В. Основы микологии: Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов. Учебное пособие. / Л.В. Гарибова, С.Н. Лекомцева. – М.: ТНИ КМК. 2005. – 220 с.
2. Бухало А.С. Лекарственные препараты и пищевые добавки из макромицетов / А.С. Бухало, Э.Ф. Соломко, С.П. Вассер, О.Б. Михайлова // Успехи медицинской микологии. – М.: Нац. акад. Микологии. – 2005. – Т. 5. – С. 254 – 256.
3. Культивирование съедобных и лекарственных грибов. Практические рекомендации / [А.С. Бухало, Н.А. Бисько, Э.Ф. Соломко, В.Т. Билай, Н.Ю. Митропольская, Н.Л. Поединок, А.А. Гродзинская, О.Б. Михайлова]; под ред. А. С. Бухало. – К.: Чернoбыльинтеринфом, 2004. – 128 с.
4. Дудка И.А. Методы экспериментальной микологии. Справочник. / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская. – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с.
5. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник / Т.П. Пирог. – К.: НУХТ, 2010. – 623 с.
6. Buchalo A.S. Catalogue of the culture collection of mushrooms / A.S. Buchalo, N.Yu. Mitropolskaya. – K., 2006. – 36 p.
7. Федотов О.В. Лікарські речовини рослин і грибів: Монографія у вигляді навчального посібника. / О.В. Федотов. – Донецьк: Норд Комп'ютер, 2007. – 204 с.
8. Хоуксворт Д.Л. Общее количество грибов, их значение в функционировании экосистем, сохранение и значение для человека / Д.Л. Хоуксворт // Микология и фитопатология. – 1992. – Т. 26. – Вып. 2. – С. 152-166.
9. Дудка І.О. Гриби заповідників та національних природних парків Лівобережної України. / І.О. Дудка, В.П. Гелюта, Т.В. Андріанова, В.П. Гайова, Ю.Я. Тихоненко, М.П. Придюк, Ю.І. Голубцова, Т.І. Кривомаз, В.В. Джамган, Д.В. Леонтьев, О.Ю. Акулов, О.В. Сивоконь. – К.: Арістей, 2009. – Т. 1. – 306 с.
10. Буценко Л.М. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Навч. посіб. / Л.М. Буценко, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог. – К.: НУХТ, 2010. – 323 с.
11. Kirk P.M. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 9th ed. / P.M. Kirk, P.F. Cannon, J.C. David, J.A. Stalpers. – Wallingford, CAB International, 2001. – 655.
12. Бухало А.С. Базидіальні макромицети з лікарськими властивостями / А.С. Бухало, Е.Ф. Соломко, Н.Ю. Митропольська // Український ботанічний журнал. – 1996. – Т. 53, № 3. – С. 192–201.
13. Патент 12384 України. Спосіб визначення стресового стану базидіоміцетів та екологічного стану місця їх зростання за вмістом продуктів перекисного окиснення ліпідів / Федотов О.В. Заяв. № u200504732, від 20.05.2005, кл. С04В35/00, А01Г7/00, С30В28/00, А01Н3/00, Бюл. № 2, від 15.02.2006.
14. Патент 34089А України. Штам соматичних структур базидіального гриба *Amyloporia lenis* (Karst.) Bond. et Sing. KB–92 (А–004) – продуцент протеолітичних ферментів / Бойко М.І., Федотов О.В., Негруцький С.Ф. Заяв. № 99063017, від 02.06.1999, кл. 6С12Н9/52, А23С19/032, Бюл. № 1, від 15.02.2001.
15. Патент 34553А України. Штам соматичних структур макромицету *Tyromyces revolutus* (Bres.) Bond. et Sing. БН–92 (А–025) – продуцент молокозсідального фермента / Федотов О.В., Бойко М.І., Негруцький С.Ф. Заяв. № 98020847, від 18.02.1998, кл. 6С12Н9/50, А23С19/032, Бюл. № 2, від 15.03.2001.
16. Патент 3863 України. Штам F–203 соматичних структур їстівного базидіоміцету *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing.– продуцент плодових тіл і міцелію з антиокисними властивостями та екзо– і ендопероксидаз / Федотов О.В. Заяв. № 2004032388, від 31.03.2004, кл. 7С12Н1/14, А01Г1/04, Бюл. № 12, від 15.12.2004.
17. Патент 39760 України. Живильне середовище для вирощування штаму P–6v *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kuntm. – продуцента каталази / Федотов О.В., Брусніцина О.М. Заяв. № u200812035, від 10.10.2008, МПК (2009), кл. С12Н9/52, А23С19/00 Бюл. № 5, від 10.03.2009.
18. Патент 46461А Україна. Штам соматичних структур їстівного базидіоміцету *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kuntm. P–01 – продуцента плодових тіл і міцелію з антиокисними властивостями / Федотов О.В., Вовк Н.В. Заяв. № 2001075193, від 20.07.2001, кл. 7С12Н1/14, А01Г1/04, Бюл. № 5, від 15.05.2002.

Надійшло до редакції 31.01.2012 р.