

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

П'ЯТЕЦЬКА ДАР'Я ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 579.64'8:[577.175.1+661.185]-044.962(043.5)

ДИСЕРТАЦІЯ

ІНТЕГРОВАНА ТЕХНОЛОГІЯ СИНТЕЗУ ФІТОГОРМОНІВ І
ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* IMB B-
7405, *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241 І
RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS IMB AC-5017

Спеціальність 162 – Біотехнології та біоінженерія

Галузь знань 16 – Хімічна та біоінженерія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

П'ятецька Д.В.

Науковий керівник: Пирог Тетяна Павлівна

доктор біологічних наук, професор



Київ - 2024

АНОТАЦІЯ

П'ятецька Д.В. «Інтегрована технологія синтезу фітогормонів і поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 і *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017»

Дисертація на здобуття освітньо-наукового ступеня доктор філософії за спеціальністю 162 Біотехнологія та біоінженерія. – Національний університет харчових технологій Міністерства освіти та науки України, Київ, 2024.

Більшість дослідників при розробці мікробних технологій дотримуються загально відомої концепції одержання одного продукту з використанням одного продуценту, акцентуючи увагу виключно на одержанні основного цільового продукту. У ту ж саму чергу можливість штамів синтезувати різні метаболіти з багатьма біологічними властивостями значно розширює область їх використання у практиці. В сучасних умовах актуальності набувають комплексні мікробні препарати для рослинництва, яким притаманна ріст-стимулювальна та антимікробна активність завдяки наявності у їх складі фітогормонів та поверхнево-активних речовин (ПАР) відповідно. Виробництво таких препаратів стримується високими витратами на біосинтез та невисокою концентрацією фітогормонів у культуральній рідині.

Одним із шляхів, який може використовуватися для інтенсифікації синтезу цільових продуктів, є внесення у середовище культивування продуцента екзогенних попередників біосинтезу. Для фітогормонів ауксинової природи таким попередником є триптофан. Крім того, одним з шляхів підвищення ефективності інтегрованих мікробних технологій є використання як субстратів дешевих і наявних у великих кількостях промислових відходів (відпрацьованої олії та відходів в виробництва біодизелю).

Дисертаційна робота присвячена розробці на основі промислових відходів ефективної технології синтезу фітогормонів та поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 й *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 для використання у рослинництві.

Встановлено можливість підвищення на кілька порядків концентрації фітогормонів ауксинової природи за наявності у середовищі, в якому культивували продуцентів поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 й *R. erythropolis* IMB Ac-5017, з токсичними промисловими відходами (відпрацьована олія, відходи виробництва біодизелю) невисоких концентрацій триптофану - екзогенного попередника їх біосинтезу.

Внесення у середовище, в якому культивували *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 й *N. vaccinii* IMB B-7405 0,3 г/л триптофану супрооджувалося інтенсифікацією синтезу ауксинів у 27, 243 та 438 разів відповідно.

Показано, що екзогенний триптофан залучається до біосинтезу ауксинів у досліджуваних продуцентів поверхнево-активних речовин через індол-3-піруватний шлях: активність триптофантрансамінази (вона є одним із ключових ферментів шляху синтезу індол-3-оцтової кислоти, який каталізує реакцію між триптофаном і 2-оксоглутаратом з утворенням індол-3-піровиноградної кислоти) підвищувалася у 2,3-5,4 разів порівняно з вирощуванням без попередника.

Встановлено, що наявність триптофану у середовищі культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 й *R. erythropolis* IMB Ac-5017 не впливала на синтез поверхнево-активних речовин, а їх антимікробна активність відносно фітопатогенних бактерій або підвищувалася, або залишалася без змін порівняно з встановленою для препаратів, синтезованих без попередника біосинтезу ауксинів. Вирощування *N. vaccinii* IMB B-7405 і *R. erythropolis* IMB Ac-5017 у середовищі з

триптофаном супроводжувалося утворенням ПАР з підвищеною антимікробною активністю: мінімальні інгібуючі концентрації щодо фітопатогенних бактерій були у 2-4 рази вище порівняно з тими показниками, які були встановлені для препаратів, що були синтезовані без попередника біосинтезу ауксинів.

Показано, що збільшення антимікробної активності поверхнево-активних речовин штамів *N. vaccinii* IMB B-7405 й *R. erythropolis* IMB Ac-5017 корелювало із збільшенням в клітинах цих штамів НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогеназної активності – ключового ферменту біосинтезу аміноліпідів, які відповідають за антимікробну дію комплексу поверхнево-активних речовин.

Встановлено, що обробка томатів, перцю та ячменю культуральною рідиною, супернатантом та фітогормональними екстрактами *N. vaccinii* IMB B-7405, *A. calcoaceticus* IMB B-7241, а також *R. erythropolis* IMB Ac-5017 супроводжувалася стимуляцією росту та розвитку рослин.

Є перспективи для розробки на основі екзометаболітів *N. vaccinii* IMB B-7405 інтегрованої технології одержання комплексного мікробного препарату з ріст-стимулювальною та антимікробною щодо фітопатогенів активністю для застосування в рослинництві, ключовими елементами якої будуть використання як субстрату відпрацьованої соняшникової олії, що не потребує стерилізації, і внесення у середовище на стадії виробничого біосинтезу 0,3 г/л триптофану.

Встановлено, що попередня обробка листя томатів у дослідженнях *in vivo* розчинами ПАР, що синтезуються *N. vaccinii* IMB B-7405 на середовищі, яке містило відпрацьовану олію та триптофан, на 100% зупиняла розвиток захворювання порівняно з листям, необробленим ПАР (ступінь ураження становив 8-50%).

У разі обробки кореневої розсади томатів розбавленою у 400 разів культуральною рідиною і супернатантом, одержаним після вирощування бактерій *N. vaccinii* IMB B-7405 у середовищі, яке містило відпрацьовану

олію і триптофан, приріст загальної ваги томатів і середньої ваги плоду підвищувався на 82-91 і 12-18% відповідно порівняно з обробкою водою.

Використання як субстратів відпрацьованої олії та відходів виробництва біодизелю дає змогу не тільки отримати високоефективні комплексні мікробні препарати з ріст-стимулювальною та антимікробною щодо фітопатогенів активністю для використання у рослинництві, а й вирішує проблему утилізації цих токсичних промислових відходів.

Ключові слова: рослинництво, ріст-стимулюючі ризобактерії, томати, антибактеріальна активність, фітопатогени, фітогормони, поверхнево-активні речовини, ферменти, біосинтез, *in vitro*

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у періодичних виданнях інших держав

1. Leonova, N., Pirog, T., Piatetska, D., Shevchuk, T., Kharkhota, M., & Iutynska, G. (2020). Synthesis of gibberellins by surfactant producers *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017. *Scientific Study & Research – Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industr.* 21(4), 497–509.

<https://dspace.nuft.edu.ua/handle/123456789/41081>

«Scientific Study & Research: Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology. Food Industry» є закордонним виданням (Румунія), міжнародна індексація Web of Science.

Статті у наукових фахових виданнях України

2. Пирог, Т. П., П'ятецька, Д., Клименко, Н. О., Шевчук, Т. А., & Леонова, Н. О. (2019). Інтенсифікація синтезу ауксинів у продуцента поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. *Наукові праці НУХТ.* 25(6), 15-23.

<https://dspace.nuft.edu.ua/handle/123456789/32665>

«Наукові праці Національного університету харчових технологій» включений до переліку наукових фахових видань за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія, категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України № 975 від 11.07.2019); міжнародна індексація: *Index Copernicus, EBSCOhost, Google Scholar*.

3. Pirog, T., Leonova, N., Piatetska, D., Klymenko, N., & Shevchuk, T. (2020). Influence of tryptophan on auxin-synthesizing ability of surfactant producer *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241. *Ukrainian Food Journal*, 9(1), 175-262. doi: 10.24263/2304-974X-2020-9-1-15

https://www.researchgate.net/publication/341512563_Influence_of_tryptophan_on_auxin-synthesizing_ability_of_surfactant_producer_Acinetobactercalcoaceticus_IMV_B-7241

«*Ukrainian Food Journal*» включений до переліку наукових фахових видань за спеціальністю 162-Біотехнології та біоінженерія, категорія А (Наказ Міністерства освіти і науки України № 358 від 15.03.2019); міжнародна індексація: *Web of Science, Google Scholar, Index Copernicus та ін.*

4. П'ятецька, Д., & Пирог, Т. (2023). Вплив екзометаболітів *Nocardia vaccini* IMB B-7405, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 і *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017 на врожайність томатів, перців та ячменю. *Наукові праці НУХТ*. 29(5), 7-20. doi: 10.24263/2225-2924-2023-29-5-3

«Наукові праці Національного університету харчових технологій» включений до переліку наукових фахових видань за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія, категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України № 975 від 11.07.2019); міжнародна індексація: *Index Copernicus, EBSCOhost, Google Scholar*.

Статті у інших наукових виданнях

5. Pirog, T. P., Leonova, N. O., Piatetska, D. V., Klymenko, N. O., Zhdanyuk, V. I., & Shevchuk, T. A. (2020). Induction of auxins synthesis by

Rhodococcus erythropolis IMV Ac-5017 with the addition of tryptophan to the cultivation medium. *Mikrobiolohichniy Zhurnal*, 82(6), 3-12. doi: 10.15407/microbiolj82.06.003

<https://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/41090>

«*Mikrobiolohichniy Zhurnal*» включено у перелік наукових фахових видань України за спеціальністю 091-Біологія, категорія А (Наказ Міністерства освіти і науки України № 1471 від 26.11.2020); міжнародна індексація: Scopus, квартиль Q4.

6. Pirog, T. P., Piatetska, D. V., Yarova, H. A., & Iutynska, G. O. (2021). The effect of surfactants of microbial origin on phytopathogenic microorganisms. *Mikrobiolohichniy Zhurnal*, 83(6), 75-94. doi: 10.15407/microbiolj83.06.075

https://www.researchgate.net/publication/357315904_The_Effect_of_Surfactants_of_Microbial-Origin_on_Phytopathogenic_Microorganisms

«*Mikrobiolohichniy Zhurnal*» включено у перелік наукових фахових видань України за спеціальністю 091-Біологія, категорія А (Наказ Міністерства освіти і науки України № 1471 від 26.11.2020); міжнародна індексація: Scopus, квартиль Q4.

7. Pirog, T., Piatetska, D., Zhdanyuk, V., Leonova, N., & Shevchuk, T. (2022). Effect of tryptophane on synthesis of certain exometabolites by bacteria of genus *Acinetobacter*, *Nocardia*, and *Rhodococcus* and their properties. *Mikrobiolohichniy Zhurnal*. 84(6), 50-61. doi: 10.15407/microbiolj84.06.050

<https://dspace.nuft.edu.ua/handle/123456789/41091>

«*Mikrobiolohichniy Zhurnal*» включено у перелік наукових фахових видань України за спеціальністю 091-Біологія, категорія А (Наказ Міністерства освіти і науки України № 1471 від 26.11.2020); міжнародна індексація: Scopus, квартиль Q4.

8. Pirog, T., Piatetska, D., Klymenko, N., & Iutynska, G. (2022). Ways of auxin biosynthesis in microorganisms. *Mikrobiolohichniy Zhurnal*. 84(2), 57-72.

<https://dspace.nuft.edu.ua/handle/123456789/41098>

«*Mikrobiologichnyi Zhurnal*» включено у перелік наукових фахових видань України за спеціальністю 091-Біологія, категорія А (Наказ Міністерства освіти і науки України № 1471 від 26.11.2020); міжнародна індексація: Scopus, кuartиль Q4.

Патенти

9. Пирог, Т.П., Леонова, Н.О., Гаврилкіна*, Д.В., Антонюк, С.І., Герштман, А.Ю. Спосіб одержання комплексного мікробного препарату Патент України на винахід № 121902. 10.08.2020.

10. Пирог, Т.П., Леонова, Н.О., Гаврилкіна*, Д.В., Антонюк, С.І., Палійчук, О.І. Спосіб одержання комплексного мікробного препарату Патент України на винахід № 123216. 03.03.2021.

11. Пирог, Т.П., Леонова, Н.О., Гаврилкіна*, Д.В., Антонюк, С.І., Луцай, Д.А. Спосіб одержання комплексного мікробного препарату Патент України на винахід № 123217. 03.03.2021.

Тези доповідей у матеріалах конференцій

12. Клименко Н.О., П'ятецька Д.В., & Пирог Т.П. (2019). Інтенсифікація синтезу ауксинів штаму *Nocardia vaccini* IMB B-7405 за умов росту на відпрацьованій олії. Матеріали Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Науково-інноваційний супровід збалансованого природокористування», Рівне, Україна, Жовтень 31, с. 80-82.

13. Пирог Т.П., П'ятецька Д.В., Клименко Н.О., Леонова Н.О., Шевчук, Т.А. (2019) Синтез гіберелінів продуцентами поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccini* IMB B-7405, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 та *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017. Програма та тези матеріалів VIII Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції», Київ, Україна, Листопад 5-6, с. 31-32.

14. Клименко Н.О., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П., Леонова Н.О., & Шевчук Т.А. (2019) Вплив попередника біосинтезу на утворення ауксинів продуцентом поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoacet* IMB

В-7241. *Збірник наукових праць «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології»*. Випуск 6, Харків, Україна, Листопад 7-8, с. 222-223.

15. Клименко, Н.О., П'ятецька, Д.В., & Пирог, Т.П. (2019) Вплив якості олії на синтез ауксинів продуцентом поверхнево-активних речовин *Nocardia vassinii* IMB В-7405. *Збірник тез VIII Міжнародної науково-практичної онлайн конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії»*, Київ, Україна, Листопад 15, с. 89-91.

16. Клименко Н.О., П'ятецька, Д.В., & Пирог, Т.П. (2019) Вплив попередника на біосинтез ауксинів продуцентом ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-724. *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Майбутній науковець – 2019»*, м. Сєвєродонецьк, Україна, Грудень 12, с. 2-14.

17. Клименко, Н.О., Жданюк, В.І., & П'ятецька, Д.В. (2020). Вплив попередника на синтез ауксинів продуцентом поверхнево-активних речовини *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017. *Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття»*, Київ, Україна, Травень 20, с. 42.

18. Жданюк, В.І., Клименко, Н.О., П'ятецька, Д.В., & Пирог, Т.П. (2020). Інтенсифікація синтезу ауксинів штамом *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017 за умов росту на етанолі. *Збірник тез Міжнародної науково-практичної конференції «Перспективні матеріали та інноваційні технології: біотехнологія, прикладна хімія та екологія»*, Київ, Травень 14-15, с. 51.

19. Клименко, Н., П'ятецька, Д., Пирог, Т., & Леонова, Н. (2020) Інтенсифікація синтезу ауксинів *Nocardia vassinii* IMB В-7405 та їх вплив на врожайність томатів. *Матеріали 86 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті»*, Київ, Україна, Квітень 2-3, с. 386.

20. Клименко Н.О., Жданюк В.І., & П'ятецька Д.В. (2020) Інтенсифікація синтезу фітогормонів ауксинової природи у продуцента поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241. VIII Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених і спеціалістів «Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур», с. Центральне, Україна, Квітень 24, с. 44.

21. Клименко Н.О., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., & Пирог Т.П. (2020). Вплив попередника синтезу ауксинів на активність триптофантрансамінази *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241. *Матеріали VI Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні питання розвитку біології та екології»*, Вінниця, Україна, Жовтень 21-22, с. 56-58.

22. Клименко Н.О., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., & Пирог Т.П. (2020) Вплив триптофану на активність триптофантрансамінази штаму *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії: матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції*, Харків, Україна, Листопад 26, с. 227-228.

23. Клименко Н.О., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., & Пирог Т.П. (2020). Синтез ауксинів продуцентом поверхнево-активних речовин *Nocardia vassinii* IMB B-7405 на промислових відходах. *Техногенно-екологічна безпека України: стан та перспективи розвитку / ТЕБ-2020: матеріали X Всеукраїнської науково-практичної Інтернет-конференції*, Ірпінь, Україна, Жовтень 20-29, с. 180-183.

24. Пирог Т.П., Леонова Н.О., Клименко Н.О., Жданюк В.І., Шевчук Т.А., & П'ятецька Д.В. (2020). Індукція синтезу ауксинів *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 за наявності триптофану. *Програма та тези матеріалів IX Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції»*, Київ, Україна, Листопад 10-11, с. 23-24.

25. Pirog T.P., Leonova N.O., Klymenko N.O., Zhdanyuk V.I., Piatetska D.V., & Shevchuk T.A. (2020). Influence of tryptophan on auxin-synthesizing ability of surfactant producer *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241. *Матеріали IX Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції»*, Київ, Україна, Листопад 10-11, с. 19-20.

26. Клименко Н.О., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., & Пирог Т.П. (2020). Вплив попередника на синтез ауксинів продуцентом поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017. *Матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції «Перспективи еко-інноваційного розвитку сільськогосподарського виробництва»*, Полтава, Україна, Листопад 20, с. 124-125.

27. Клименко Н.О., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П. (2020). Вплив попередника синтезу ауксинів на активність триптофантрансамінази *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017. *Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Майбутній науковець – 2020»*, Сєвєродонецьк, Україна, Грудень 4, с. 31-32.

28. П'ятецька Д.В., Жданюк В.І., Пирог Т.П., Леонова Н.О., & Шевчук Т.А. (2021). Синтез стимуляторів росту рослин продуцентами поверхнево-активних речовин за наявності триптофану. *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «Роль науково-технічного забезпечення розвитку агропромислового комплексу в сучасних ринкових умовах»*, Дніпро, Україна, Лютий 25, с. 251-252.

29. Piatetska D., Zhdanyuk V., & Pirog T. (2021). Involvement of exogenous tryptophan in the biosynthesis of auxins by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ас-5017. *Матеріали 87 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті»*, Київ, Україна, Квітень 15–16, с. 384.

30. Piatetska D., Zhdanyuk V., & Pirog T. (2021). Activity of tryptophan transaminase of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 under the influence of tryptophan. *Матеріали XVII міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «МОЛОДЬ І ПОСТУП БІОЛОГІЇ»*, Львів, Україна, Квітень 19-21, с. 78.

31. П'ятецька Д.В., Пирог Т.П., & Шевчук Т.А. (2021). Вплив триптофану на активність ключового ферменту індол-3-піруватного шляху у продуцентів поверхнево-активних речовин. *Матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття» присвяченої 20-річчю Факультету біотехнології і біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського*, Київ, Україна, Квітень 23, с. 74.

32. Пирог Т.П., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Леонова Н.О., & Шевчук Т.А. (2021). Інтенсифікація синтезу гіберелінів *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 за наявності еритритолу. *Програма та тези матеріалів X Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції»*, Київ, Україна, Листопад 09-10, с. 65.

33. Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П., Леонова Н.О., & Шевчук Т.А. (2021). Утворення гіберелінів за внесення попередника біосинтезу у середовище культивування *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. *Матеріали X Міжнародної науково-технічної конференції «Технічний прогрес у тваринництві та кормовиробництві»*, Київ, Україна, Жовтень 4-23, с. 20.

34. Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П., Леонова Н.О., & Шевчук Т.А. (2021) Утворення ауксинів продуцентами поверхнево-активних речовин за наявності триптофану. *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної онлайн-конференції «Біологічні аспекти оптимізації продукційного процесу культурних рослин»*, Чернігів, Україна, Жовтень 26-27, с. 29.

35. Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П., Леонова Н.О., & Шевчук Т.А. (2021) Екзогенний еритритол як попередник інтенсифікації синтезу гіберелінів *Nocardia vassinii* ІМВ В-7405. *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної онлайн-конференції «Біологічні аспекти оптимізації продукційного процесу культурних рослин»*, Чернігів, Україна, Жовтень 26-27, с. 26.

36. Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П., Леонова Н.О., & Шевчук Т.А. (2021). Вплив ріст стимулювальних екзометаболітів *Nocardia vassinii* ІМВ В-7405 на врожайність томатів *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної онлайн-конференції «Біологічні аспекти оптимізації продукційного процесу культурних рослин»*, Чернігів, Україна, Жовтень 26-27, с.139.

* - прізвище Гаврилкіна змінено на П'ятецька.

SUMMARY

Piatetska D.V. "Integrated technology for the synthesis of phytohormones and surfactants of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017"

Dissertation for obtaining the educational and scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 162 Biotechnology and bioengineering. – National University of Food Technologies of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2024.

Most researchers in the process of developing microbial biotechnologies adhere to the generally accepted concept of "one producer – one product", focusing only on the synthesis of the target product. Nevertheless, the ability of strains to synthesize a complex of metabolites with different biological effects significantly expands the scope of their use in practice. In modern conditions, preparations for crop production, which have growth-stimulating activity due to the presence of phytohormones, and antimicrobial activity due to the presence of surface-active substances (surfactants), are gaining relevance. The production of such preparations is restrained by high costs of biosynthesis and relatively low concentrations of metabolites in the culture broth.

According to the literature, one of the main approaches to increasing the concentration of the target product can be the introduction of biosynthesis precursors. For auxins, such a precursor is tryptophan.

The dissertation is devoted to the development of an effective technology for the synthesis of phytohormones and surface-active substances of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, and *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 for use in crop production with the aim of simultaneous toxic waste disposal.

The possibility of increasing the concentration of phytohormones of auxin nature by several orders of magnitude in the presence of low concentrations of tryptophan (the exogenous precursor of their biosynthesis) in the cultivation medium of surfactant producers *A. calcoaceticus* IMV B-7241, *N. vaccinii* IMV

B-7405 and *R. erythropolis* IMV As-5017 with toxic industrial waste (waste oil, biodiesel production waste) is established.

The addition of 0.3 g/l tryptophan to the culture medium of *A. calcoaceticus* IMV B-7241, *N. vaccinii* IMV B-7405 and *R. erythropolis* IMV As-5017 was accompanied by the intensification of auxin synthesis by 27, 243, and 438 times, respectively.

It was shown that exogenous tryptophan is involved in the biosynthesis of auxins in the studied producers of surfactants through the indole-3-pyruvate pathway: the activity of tryptophan transaminase (one of the key enzymes in the synthesis of indole-3-acetic acid, which catalyzes the reaction of the formation of indole-3-pyruvic acid from tryptophan and 2-oxoglutarate) increased by 2,3-5,4 times compared to cultivation without a precursor.

It was established that the addition of tryptophan in the medium of *R. erythropolis* IMV As-5017, *A. calcoaceticus* IMV B-7241 and *N. vaccinii* IMV B-7405 did not affect the level of synthesis of surfactants, and their antimicrobial activity against phytopathogenic bacteria (*Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium carotovorum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria*) either increased or did not changed compared to that data, established for preparations synthesized without a precursor of auxin biosynthesis. Cultivation of *N. vaccinii* IMV B-7405 and *R. erythropolis* IMV Ac-5017 in a medium with tryptophan was accompanied by the formation of surfactants with increased antimicrobial activity: the minimum inhibitory concentrations against phytopathogenic bacteria were 2-4 times higher compared to the indicators established for preparations synthesized without auxin biosynthesis precursor. The increase in antimicrobial activity correlated with an increase in the cells of these strains of NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase activity – the key enzyme in the biosynthesis of aminolipids, which are responsible for the antimicrobial activity of the surfactant complex.

It was found that the treatment of tomatoes, pepper and barley with culture broth, supernatant and phytohormonal extracts of *N. vaccinii* IMV B-7405, *A. calcoaceticus* IMV B-7241 and *R. erythropolis* IMV As-5017 was accompanied by stimulation of plant growth and development.

There are prospects for the building of an integrated technology for the preparation of a complex microbial preparation with ability to stimulate the plant growth and antimicrobial activity against phytopathogens for use in crop production, based on the exometabolites of *N. vaccinii* IMV B-7405. The key elements of the technology will be the use of waste sunflower oil as a substrate, which does not require sterilization, and introducing 0.3 g/l of tryptophan into the medium at the stage of production biosynthesis.

On the basis of the exometabolites of *N. vaccinii* IMV B-7405, an integrated technology for obtaining a complex microbial preparation with growth-stimulating and antimicrobial activity against phytopathogens for use in crop production was developed, the key elements of which are the use of waste sunflower oil as a substrate, which does not require sterilization, and introduction of 0.3 g/l tryptophan into medium at the stage of production biosynthesis.

It was established that pre-treatment of tomato leaves in studies *in vivo* with surfactant solutions isolated from this culture broth stopped the development of the disease by 100% compared to the leaves not treated with surfactants (the degree of damage was 8-50%).

In the case of treatment of tomato root seedlings with a 400-fold diluted culture broth and supernatant after cultivation of *N. vaccinii* IMV B-7405 in a medium, which contained waste oil and tryptophan, the growth in the total weight and the average weight of tomatoes increased by 82-91 and 12-18%, respectively, compared with water treatment.

The use of waste oil and waste from biodiesel production as substrates allows not only to obtain highly effective complex microbial preparations with ability to stimulate plant growth and antimicrobial activity against phytopathogens for use in crop production, but also solves the problem of disposal

of these toxic industrial wastes.

Key words: plant growing, growth-promoting rhizobacteria, tomatoes, antibacterial activity, phytopathogens, phytohormones, surfactants, enzymes, biosynthesis, *in vitro*

ЗМІСТ

ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД. ШЛЯХИ БІОСИНТЕЗУ АУКСИНІВ У МІКРООРГАНІЗМІВ	30
1.1. Триптофан-залежний шлях біосинтезу ауксинів	31
1.1.1. Шлях через індол-3-піруват.	32
1.1.2. Шлях через індол-3-ацетамід.....	35
1.1.3. Шлях через індол-3-ацетонітрил.	39
1.1.4. Генетично модифіковані продуценти індол-3-оцтової кислоти.	40
1.2. Підходи до інтенсифікації продукування індол-3-оцтової кислоти	42
1.2.1. Внесення у середовище попередника біосинтезу.	46
1.2.2. Вплив інших факторів на синтез індол-3-оцтової кислоти у бактерій.	50
Висновки до розділу 1	55
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	56
2.1. Об'єкти досліджень	56
2.2. Культивування продуцентів поверхнево-активних речовин.....	56
2.3. Одержання екстрактів з фітогормональною активністю	58
2.3.1. Одержання фітогормональних екстрактів	58
2.3.2. Визначення якісного і кількісного складу фітогормонів.	58
2.4. Ензиматичні аналізи	60
2.4.1. Одержання безклітинних екстрактів.....	60
2.4.2. Аналіз активності триптофантрансамінази.....	61
2.5. Одержання препаратів поверхнево-активних і визначення їх кількості.....	61
2.6. Дослідження антимікробної активності ПАР	62

2.7. Визначення впливу екзометаболітів на ріст і врожайність томатів, перців та ячменю	63
2.8. Визначення захисної дії поверхнево-активних речовин штаму ІМВ В-7405 проти бактеріозів томатів	64
2.9. Статистична обробка експериментальних результатів	65
РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> ІМВ В-7241, <i>NOCARDIA VACCINII</i> ІМВ В-7405 ТА <i>RHODOCOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> ІМВ АС-5017 НА ВРОЖАЙНІСТЬ ПЕРЦІВ, ТОМАТІВ ТА ЯЧМЕНЮ	
3.1. Синтез фітогормонів продуцентами поверхнево-активних речовин	67
3.2. Врожайність пивоварного ячменю при обробці позаклітинними метаболітами штамів ІМВ В-7241, ІМВ В-7405 та ІМВ Ас-5017	68
3.3. Вплив екзометаболітів <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ В-7241, <i>Nocardia vaccinii</i> ІМВ В-7405, а також <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017 на кількість врожаю томатів.....	69
3.4. Урожайність перців за дії екзометаболітів штамів ІМВ Ас-5017, ІМВ В-7405, ІМВ В-7241	72
Висновки до розділу 3	73
РОЗДІЛ 4. ІНТЕНСИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ ФІТОГОРМОНІВ АУКСИНОВОЇ ПРИРОДИ ЗА НАЯВНОСТІ ПОПЕРЕДНИКА	
4.1. Синтез ауксинів <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017, <i>Nocardia vaccinii</i> ІМВ В-7405 та <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ В-7241 за наявності триптофану в культуральному середовищі.....	74
4.2. Вплив умов культивування <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017, <i>Nocardia vaccinii</i> ІМВ В-7405 й <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ В-7241 на активність ключового ферменту біосинтезу ауксинів	79
4.3. Врожайність томатів за дії екзометаболітів <i>Nocardia vaccinii</i> ІМВ В-7405, які були синтезовані за наявності триптофану.....	81
Висновки до розділу 4	82

РОЗДІЛ 5. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН, СИНТЕЗОВАНИХ ЗА НАЯВНОСТІ ПОПЕРЕДНИКА БІОСИНТЕЗУ АУКСИНІВ	83
5.1. Антимікробна активність поверхнево-активних речовин, одержаних на середовищі з триптофаном, відносно фітопатогенних бактерій	83
5.2. Вплив триптофану на антимікробну активність поверхнево- активних речовин, які синтезовані <i>Rhodococcus erythropolis</i> IMB Ac-5017, <i>Nocardia vaccinii</i> IMB B-7405 й <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241 ...	84
5.3. Активність ключових ферментів біосинтезу поверхнево-активних речовин	86
5.4. Вплив поверхнево-активних речовин на збудників бактеріозів томатів у дослідженнях <i>in vivo</i>	88
Висновки до розділу 5	90
РОЗДІЛ 6. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	92
ВИСНОВКИ.....	107
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	109
ДОДАТКИ.....	125
ДОДАТОК А. Акт впровадження результатів у навчальний процес	125
ДОДАТОК Б. Патенти на винахід.....	127
ДОДАТОК В. Список публікацій за темою дисертації	133

ВСТУП

В сучасному світі монобіотехнології, суть яких полягає в одержанні одного цільового продукту з одного вуглецевого субстрату та одного продуценту, змінюються «інтегрованими біотехнологіями», в яких з використанням одного продуценту можна одержати кілька цільових продуктів (Hori, 2011; Krishnan, 2019; Nitschke, 2011; Pirog, 2019b; Que, 2014; Zhang, 2020). Очевидно, що такі технології є дуже ефективними:

- замість кількох технологічних процесів реалізується один;
- сфери застосування цільового продукту розширюються завдяки наявності кількох метаболітів з різноманітними властивостями на противагу монопрепарам (Pirog, Kliuchka, Klymenko, Shevchuk, & Iutynska, 2019b).

У літогляді (Pirog, Kliuchka, Klymenko, Shevchuk, & Iutynska, 2019b) ми підсумували наявні поодинокі дані щодо біосинтезу продуцентами поверхнево-активних речовин (ПАР) як супутніх метаболітів фітогормонів ауксинової природи. У той же час ПАР мікробного походження завдяки комплексу унікальних властивостей (здатність до зниження поверхневого та міжфазного натягу, емульгування різних субстратів, деструкції біоплівки, антимікробній та антиадгезивній активності), є препаратами з різноманітними призначеннями і можуть використовуватися в фармацевтичній, харчовій промисловості, а також медицині, сільському господарстві та у природоохоронних технологіях (Fenibo, 2019; Pirog, 2019b).

У попередніх дослідженнях ми встановили здатність продуцентів ПАР *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 й *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 синтезувати фітогормони, які проявляють стимулювальну дію – цитокініни, ауксини та гібереліни (Pirog, 2015; Pirog, 2019a; Pirog, 2019b).

Комплексний препарат на основі штамів *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 й *R. erythropolis* IMB Ac-5017, який містить ПАР і

фітогормони, може використовуватися у рослинництві, оскільки ПАР цих штамів володіють антиадгезивною та антимікробною активністю (зокрема, щодо фітопатогенних бактерій (Pirog, Konon, Sofilkanich, & Iutinskaya, 2013)). Разом з тим, концентрація фітогормонів, синтезованих штамми, була невисокою (<100 мкг/л), що значно знижувало ефективність застосування препарату для стимуляції росту і розвитку рослин.

В сучасних біотехнологіях одним з підходів до підвищення концентрації цільового продукту може бути внесення попередників біосинтезу. Так, більшість дослідників (Liu, 2019; McClerklin, 2018; Shim, 2015) проводять визначення здатності мікроорганізмів до синтезу ауксинів із додаванням у середовище культивування триптофану, який є прекурсором утворення індол-3-оцтової кислоти (ІОК). Отже, існують потенційні можливості для підвищення синтезу ауксинів продуцентами ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405, а також *R. erythropolis* IMB Ac-5017.

Слід зазначити, що і ПАР, і фітогормони є вторинними метаболітами, які зазвичай синтезуються як комплекс подібних сполук, у яких склад і співвідношення може змінюватися залежно від умов культивування (Pirog, Kliuchka, Shevchuk, & Muchnyk, 2019c). У зв'язку з чим є необхідність визначити, чи знижується антимікробна активність ПАР, синтезованих за наявності в середовищі культивування триптофану.

Продуценти, здатні до синтезу високих концентрацій фітогормональних сполук з ріст-стимулювальною активністю, а також поверхнево-активних речовин з антимікробною активністю, є перспективними агентами для створення інтегрованої технології одержання комплексного мікробного препарату.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана на базі кафедри біотехнології та мікробіології Національного університету харчових технологій (НУХТ) згідно держбюджетної наукової тематики кафедри «Розробка

високоєфективних ресурсозберігаючих біотехнологій з метою їх впровадження у мікробіологічну, фармацевтичну та харчову промисловість» (2014-2018 рр., № державної реєстрації 0114U003437) та «Біотехнологічний потенціал мікроорганізмів природних та техногенних екосистем» (2019-2023 рр., № державної реєстрації 0119U001485), а також у рамках проектів державного замовлення Міністерства освіти і науки України «Фізіологічні основи регуляції мікробного синтезу як підґрунтя для створення біотехнологій комплексних препаратів з стабільними поліфункціональними властивостями» (номер державної реєстрації 0116U001530, 2016–2018 рр.) та «Комплексні мікробні препарати мультифункціонального призначення: від регуляції біосинтезу та властивостей до перспектив практичного використання» (номер державної реєстрації 0119U002575, 2019–2021 рр.).

Мета і завдання дослідження.

Мета дисертаційної роботи – розробити інтегровану технологію одержання комплексного мікробного препарату з ріст-стимулювальними та антимікробними властивостями на основі екзометаболітів *N. vaccinii* IMB B-7405, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 та *A. calcoaceticus* IMB B-7241.

Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати наступні завдання:

- дослідити вплив позаклітинних метаболітів *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *N. vaccinii* IMB B-7405 й *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на ріст і врожайність томатів, перців і ячменю;
- встановити, яка концентрація триптофану і який момент його внесення у середовище культивування продуцентів ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 й *R. erythropolis* IMB Ac-5017 є оптимальними для забезпечення максимального синтезу ауксинів;
- дослідити вплив триптофану у середовищі культивування бактерій *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 й *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на утворення поверхнево-активних

речовин та їхню антимікробну активність щодо фітопатогенних бактерій;

- дослідити здатність ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 до біоконтролю чисельності фітопатогенних бактерій у вегетаційних умовах;
- перевірити ефективність застосування комплексного мікробного препарату, основою якого є бактерії *N. vaccinii* IMB B-7405, у вегетаційних умовах для стимуляції росту і підвищення врожайності томатів;

Об'єкти досліджень – продуценти ПАР та фітогормонів *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 й *R. erythropolis* IMB Ac-5017.

Предмет досліджень - вплив фітогормонів та поверхнево-активних речовин, одержаних на різних вуглецевих субстратах та за наявності триптофану, на ріст і розвиток різних культур рослин (ячмінь, перці, томати); ауксин-синтезувальна здатність *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 й *R. erythropolis* IMB Ac-5017.

Методи досліджень. Під час виконання дисертаційної роботи використовували такі методи досліджень: фізико-хімічні (визначення концентрації ауксинів, цитокінінів, гіберелінів, концентрації ПАР); біотехнологічні (культивування штамів бактерій *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 й *R. erythropolis* IMB Ac-5017); мікробіологічні (визначення мінімальної інгібуючої концентрації ПАР); біологічні (вирощування культур рослин, аналіз кількості та ваги плодів, аналіз ступеня ураження листя); математичні (статистична обробка результатів досліджень MS Excel, Mathcad).

Наукова новизна отриманих результатів.

Встановлено можливість підвищення на кілька порядків концентрації фітогормонів ауксинової природи за наявності у середовищі, в якому культивували продуцентів поверхнево-активних речовин: *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *N. vaccinii* IMB B-7405 й *A. calcoaceticus* IMB B-7241 – з

токсичними промисловими відходами (відпрацьована олія, відходи виробництва біодизелю) невисоких концентрацій триптофану - екзогенного попередника їх біосинтезу.

Внесення у середовище, в якому культивували *R. erythropolis* IMB Ас-5017, *N. vaccinii* IMB В-7405 й *A. calcoaceticus* IMB В-7241 0,3 г/л триптофану супрооджувалося інтенсифікацією синтезу ауксинів у 27, 243 та 438 разів відповідно.

Показано, що екзогенний триптофан залучається до біосинтезу ауксинів у досліджуваних продуцентів поверхнево-активних речовин через індол-3-піруватний шлях: активність триптофантрансамінази (вона є одним з ключових ферментів шляху синтезу індол-3-оцтової кислоти, який каталізує реакцію між триптофаном і 2-оксоглутаратом з утворенням індол-3-піровиноградної кислоти) підвищувалася у 2,3-5,4 разів порівняно з вирощуванням без попередника.

Встановлено, що наявність триптофану у середовищі культивування бактерій *A. calcoaceticus* IMB В-7241, *N. vaccinii* IMB В-7405, а також *R. erythropolis* IMB Ас-5017 не впливала на синтез поверхнево-активних речовин, а їх антимікробна активність відносно фітопатогенних бактерій або підвищувалася, або залишалася без змін порівняно з встановленою для препаратів, синтезованих без попередника біосинтезу ауксинів. Вирощування як *N. vaccinii* IMB В-7405, так і *R. erythropolis* IMB Ас-5017 у середовищі з триптофаном супроводжувалося утворенням ПАР з підвищеною антимікробною активністю: мінімальні інгібуючі концентрації щодо фітопатогенних бактерій були у 2-4 рази вищими порівняно з показниками, встановленими для препаратів, синтезованих без попередника біосинтезу ауксинів.

Показано, що збільшення антимікробної активності поверхнево-активних речовин штамів *N. vaccinii* IMB В-7405 й *R. erythropolis* IMB Ас-5017 корелювало із збільшенням в клітинах цих штамів НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогеназної активності – ключового ферменту біосинтезу

аміноліпідів, які відповідають за антимікробну дію комплексу поверхнево-активних речовин.

Практичне значення отриманих результатів.

Встановлено, що обробка томатів, перцю та ячменю культуральною рідиною, супернатантом та фітогормональними екстрактами і *A. calcoaceticus* IMB B-7241, і *N. vaccinii* IMB B-7405, і *R. erythropolis* IMB Ac-5017 супроводжувалася стимуляцією росту та розвитку рослин.

Є перспективи для розробки на основі екзометаболітів *N. vaccinii* IMB B-7405 інтегрованої технології одержання комплексного мікробного препарату з ріст-стимулювальною та антимікробною щодо фітопатогенів активністю для застосування в рослинництві, ключовими елементами якої будуть використання як субстрату відпрацьованої соняшникової олії, що не потребує стерилізації, і внесення у середовище на стадії виробничого біосинтезу 0,3 г/л триптофану.

Встановлено, що попередня обробка листя томатів у дослідженнях *in vivo* розчинами ПАР, синтезованих бактеріями *N. vaccinii* IMB B-7405 на відпрацьованій олії за наявності триптофану, на 100% зупиняла розвиток захворювання порівняно з листям, необробленим ПАР (ступінь ураження становив 8-50%).

У разі обробки кореневої розсади томатів розбавленою у 400 разів культуральною рідиною і супернатантом, одержаним після вирощування бактерій *N. vaccinii* IMB B-7405 у середовищі, яке містило відпрацьовану олію і триптофан, приріст загальної ваги томатів і середньої ваги плоду підвищувався на 82-91 і 12-18% відповідно порівняно з обробкою водою.

Використання як субстратів відпрацьованої олії та відходів виробництва біодизелю дає змогу не тільки отримати вискоєфективні комплексні мікробні препарати з ріст-стимулювальною та антимікробною щодо фітопатогенів активністю для використання у рослинництві, а й вирішує проблему утилізації цих токсичних промислових відходів.

Спосіб одержання комплексних мікробних препаратів на основі *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 й *R. erythropolis* IMB Ac-5017, захищено патентами України на винахід:

1. UA 121902. Публікація 10.08.2020.
2. UA 123216. Публікація 03.03.2021.
3. UA 123217. Публікація 03.03.2021.

Результати наукових досліджень впроваджені у навчальний процес як нова навчальна дисципліна «Інтегровані мікробні технології», а також як модулі навчальних дисциплін «Інтенсифікація технологій мікробного синтезу» та «Біотехнологічні студії» для підготовки докторів філософії за спеціальністю 162 «Біотехнології і біоінженерія».

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною роботою автора. Дисертантом проаналізовано іноземну та вітчизняну наукову літературу з досліджуваної проблеми, проведено експериментальні дослідження, узагальнено отримані експериментальні дані, проведено їхній порівняльний аналіз з літературними даними.

Планування експериментальних робіт, їх аналіз, підготовка публікацій за результатами досліджень проходили за безпосередньої участі наукового керівника доктора біологічних наук, професора Пирог Т.П.

Визначення антимікробної активності поверхнево-активних речовин, підготовка проб, підготовка посівного матеріалу, вирощування досліджуваних штамів, визначення концентрації фітогормонів здійснювалися спільно з магістрами кафедри біотехнології і мікробіології НУХТ Жданюк В.І. та Клименко Н.О., які є співавторами публікацій.

Апробація матеріалів дисертації. Основні матеріали дисертаційної роботи було представлено на Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Науково-інноваційний супровід збалансованого природокористування» (Рівне, Україна, 2019), VIII Міжнародній науково-технічній конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» (Київ, Україна, 2019),

VIII Міжнародній науково-практичній онлайн конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, Україна, 2019), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Майбутній науковець – 2019» (Сєверодонецьк, Україна, 2019), XIV Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (Київ, Україна, 2020), Міжнародній науково-практичній конференції «Перспективні матеріали та інноваційні технології: біотехнологія, прикладна хімія та екологія» (Київ, Україна, 2020), 86 Міжнародній науковій конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (Київ, Україна, 2020), VIII Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених і спеціалістів «Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур» (с. Центральне, Україна, 2020), VI Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні питання розвитку біології та екології» (Вінниця, Україна, 2020), V Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (Харків, Україна, 2020), X Всеукраїнській науково-практичній Інтернет-конференції «Техногенно-екологічна безпека України: стан та перспективи розвитку / ТЕБ-2020» (Ірпінь, Україна, 2020), IX Міжнародній науково-технічній конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» (Київ, Україна, 2020), II Міжнародній науково-практичній конференції «Перспективи еко-інноваційного розвитку сільськогосподарського виробництва» (Полтава, Україна, 2020), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Майбутній науковець – 2020» (Сєверодонецьк, Україна, 2020), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Роль науково-технічного забезпечення розвитку агропромислового комплексу в сучасних ринкових умовах» (Дніпро, Україна, 2021), 87 Міжнародній науковій конференції

молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (Київ, Україна, 2021), XVII міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, Україна, 2021), XV Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття» присвяченій 20-річчю Факультету біотехнології і біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського (Київ, Україна, 2021), X Міжнародній науково-технічній конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» (Київ, Україна, 2021), X Міжнародній науково-технічній конференції «Технічний прогрес у тваринництві та кормовиробництві» (Київ, Україна, 2021), Міжнародній науково-практичній конференції «Аграрна освіта: минуле, сучасне, майбутнє» (м. Слов'янськ, Україна, 2021), Всеукраїнській науково-практичній онлайн-конференції «Біологічні аспекти оптимізації продукційного процесу культурних рослин» (Чернігів, Україна, 2021).

Публікації. За результатами роботи опубліковано 36 наукових праць, у тому числі 8 статей, серед яких 1 – у науковому виданні країн Європейського Союзу (міжнародна індексація Web of Science); 3 – у наукових фахових виданнях України за спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія, з яких – 1 стаття у журналі бази даних Web of Science, категорії «А»; 4 – в інших наукових виданнях України, категорії «А»; 25 тез доповідей – опублікованих у вітчизняних та закордонних науково-практичних конференціях; одержано 3 патенти України на винахід.

Структура роботи. Дисертаційна робота складається зі вступу, 7 розділів, висновків, списку використаних джерел (113 найменувань), 1 додатку. Основні матеріали викладено на 108 сторінках тексту, який містить 16 таблиць та 5 рисунків.

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД. ШЛЯХИ БІОСИНТЕЗУ АУКСИНІВ У МІКРООРГАНІЗМІВ

Ауксини є одними з найпоширеніших та найбільш детально вивчених в природі гормонів. Більше ста років тому з'явилися відомості про присутність в рослинах біологічно-активних речовин зі здатністю до стимуляції росту рослин. Так, український вчений М.Г. Холодний у 1924-1928 рр. вперше виділив індол-3-оцтову кислоту (ІОК) з коріння, стебла та листків рослин. Це перший ауксин, який отримав назву гормон росту рослин (Tsygankova, Galkina, Musatenko, & Sytnik, 2005).

Крім рослин, асоційовані з рослинами мікроорганізми (Estenson, 2018; Ghosh, 2015; Imada, 2017; Lin, 2018; Molina, 2018; Ouyang, 2017; Rivera, 2018; Rodrigues, 2016; Sun, 2018), фітопатогенні бактерії (Aragón, 2014; Huang, 2015; McClerklin, 2018) і гриби (Legault, 2011; Luo, 2016; Tsavkelova, 2012) також здатні утворювати ІОК у достатньо високих концентраціях. Серед властивостей бактеріальної ІОК збільшення кількості і довжини додаткових і головного кореня, активація ділення клітин камбрію, прискорення зав'язування плодів, сприяння коренеутворенню, а також розтягнення клітин в колеоптилях і пагонах рослин.

Втім, високі концентрації ІОК можуть навпаки діяти як фактор патогенності бактерії і грибів відносно рослин. Високі кількості ІОК призводять до безконтрольного росту рослин, внаслідок чого пошкоджуються покривні тканини, а через ці розриви всередину рослини-хазяїна проникають фітопатогени (Dusa, Rose, & Glick, 2014).

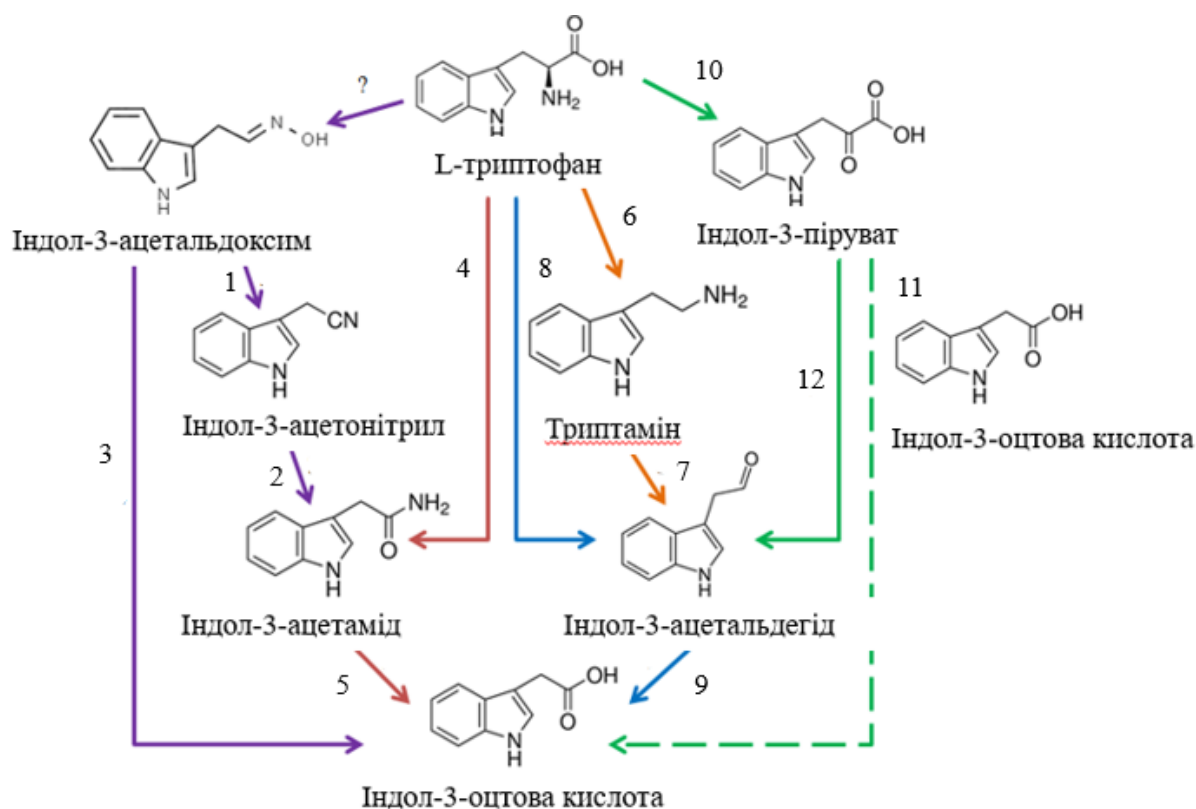
L-триптофан, що за хімічною природою є гетероциклічною амінокислотою - це основний попередник біосинтезу ІОК (Lehmann та ін., 2010). Синтез ауксинів може відбуватися двома біосинтетичними шляхами. Перший – це перетворення триптофану в ІОК декількома стадіями (триптофан-залежний шлях). Другий – це перетворення із залученням інших інтермедіатів, наприклад, аценітрилу (триптофан-незалежний). Щодо

останнього шляху біосинтезу ауксинів в доступній літературі відсутні дані, чи функціонує він у мікроорганізмів. Повне розуміння шляхів регуляції і синтезу ауксинів у бактерій необхідне для створення препаратів для рослинництва, що тісно пов'язано з одержанням штамів бактерій, здатних до синтезу високих концентрацій ІОК.

1.1. Триптофан-залежний шлях біосинтезу ауксинів

Існує три варіанти асиміляції триптофану у мікроорганізмів залежно від утворених проміжних продуктів. Є індол-3-піруватний (ІП), індол-3-ацетонітрильний шляхи (ІАН) та індол-3-ацетамідний (ІАМ) (Duca, Rose, & Glick, 2014).

На рис. 1.1. наведено схему триптофан-залежного шляху синтезу ІОК у мікроорганізмів.



Ферменти: 1 – ацеталдоксимдегідратаза; 2 – нітрилгідратаза; 3 – нітрілаза; 4 – триптофан-2-монооксигеназа; 5 – індолілацетамінгідролаза; 6 – триптофандекарбоксилаза; 7 – аміноксидаза; 8 – оксидаза бічного ланцюга триптофана; 9 – індоліл-3-ацетальдегідоксидази; 10 – триптофанамінотрансфераза; 11 – індоліллактатдегідрогеназа; 12 – індоліл-3-піруватдекарбоксилаза; знаком запитання відмічено невідомий фермент.

Рис. 1.1. Шляхи синтезу ІОК (повністю) у бактерій.

1.1.1. Шлях через індол-3-піруват. У рослин і бактерій функціонує основний шлях синтезу індол-3-оцтової кислоти – це індол-3-піруватний шлях.

На першому етапі під дією ферменту триптофанамінотрансферази (КФ 2.6.1.99) L-триптофан дезамінується до індол-3-пірувату, потім індоліл-3-піруватдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.74) – ключовий фермент ІІІ-шляху, сприяє перетворенню індол-3-пірувату в індол-3-ацетальдегід, який потім окислюється до ІОК під впливом індоліл-3-ацетальдегідоксидази (КФ 1.2.3.7) (Cerboneschi, 2016; Olanrewaju, 2017).

PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria – ризобактерії, які стимулюють ріст рослин) є найпоширенішою групою бактерій, які мають високу здатність до синтезу ауксинів. Перш за все, це зумовлено тим, що PGPR-бактерії мешкають у ризосфері рослин і тісно взаємодіють з рослиною-хазяїном (Imada, de Oliveira, Hungria, & Rodrigues, 2017). Симбіотичні, ризосферні та вільноіснуючі мікроорганізми належать до групи PGPR.

Симбіотичні мікроорганізми. Такі мікроорганізми характерні тим, що утворюють з рослиною-живителем взаємовигідний симбіоз (Imada, de Oliveira, Hungria, & Rodrigues, 2017).

Imada зі співавт. (Imada, de Oliveira, Hungria, & Rodrigues, 2017) встановили, що штам *Rhizobium tropici* CIAT 899, який існує у симбіотичних зв'язках з рослиною і здатний до азотфіксації, утворює 33,03 мкг/мл ІОК в середовищі, яке містить 100 мг/л триптофану. Шляхом аналізу геному *R. tropici* CIAT 899 були ідентифіковані гени *y4wE*, *lao* та *iorA*, що вказує на можливу участь цих генів у біосинтезі ІОК через індол-3-піруват. Крім того, при вирощуванні штаму в присутності триптофану, транскрипційна активність генів *y4wE*, *lao* та *iorA* підвищувалася у 1,33, 1,45 та 2,21 рази, відповідно, порівняно такою у штаму, вирощеного у відсутності попередника.

Ризосферні, філосферні та ендоефітні бактерії. У бактерій роду *Enterobacter* встановлено функціонування ІІІ-шляху біосинтезу ІОК (Ghosh, 2015; Zhang, 2020).

Вчені з Індії (Ghosh, Sen, & Maiti 2015) з ризосфери Абрису молитовного (*Abrus precatorius*) виділили декілька штамів ентеробактерій *Enterobacter* sp. (A7СК, A3СК, A27СК). При дослідженні впливу джерел вуглецю та азоту на ауксин-синтезувальну здатність штамів було досягнуто максимальної кількості ІОК (430 мкг/мл) при культивуванні штаму A3СК на середовищі з 0,5% манітолу і 0,2% L-аспарагіну, що в 1,7 разів більше, ніж при вирощуванні цього штаму на вказаному середовищі (245 мкг/мл) без екзогенного внесення манітолу і L-аспарагіну.

В іншій роботі (Zhang, Wang, & Hu, 2020) описано новий штам *Enterobacter xiangfangensis* BHW6, виділений з ризосфери кукурудзи, у якого виявлено послідовність *ipdC*, що кодує ключовий фермент ІІІ-шляху. При внесенні в середовище культивування штаму BHW6 15 г/л триптофану рівень синтезу ІОК становив 1,13 мг/мл.

У 2018 р. було опубліковано роботу (Rivera та ін., 2018), в якій шляхом внесення ароматичних та лінійних амінокислот в середовище культивування декількох штамів *Azospirillum brasilense*: Az39, Sp245, та Cd – відбувалася регуляція синтезу ІОК. Крім того, було встановлено, що в присутності 0,1 мг/мл триптофану штами Sp245, Az39 та Cd синтезують ІОК (концентрації становили 5,73, 6,09 та 6,27 мкг/мл відповідно).

В роботі (Rodrigues, Gudiña, Teixeira, & Rodrigues, 2017) авторами було вказано, ендоефіт, який населяє коріння та стебло очерету цукрового, *Glucanacetobacter diazotrophicus* PAL5 утворює ІОК через ІІІ-шлях. Це було визначено завдяки створенню двох мутантних штамів Gdiaa34 та Gdiaa01, які через мутацію не утворювали індол-3-піруват, індол-3-лактат (інтермедіати ІІІ-шляху) та ІОК. На відміну від них, за вирощування дикого штаму PAL5 на середовищі, яке містило 0,1 г/л триптофану, сума індольних

сполук становила 117,7 мкг/мл (індол-3-оцтова кислота, індол-3-піруват, індол-3-лактат).

У 2018 р. автори роботи (Estenson та ін., 2018) досліджували ризосферний штам *Pantoea* sp. YR343, який був ізольований з кореневої зони тополі дельтовидної (*Populus deltoides*), і досліджували його шлях синтезу ІОК. Геномний аналіз штаму YR343 показав, що за наявності 1 mM (0,2 г/л) триптофану активними були 7 трансфераз ароматичних амінокислот і 17 альдегіддегідрогеназ, які каталізують реакції одержання ІОК з триптофану через індол-3-піруват.

Вчені (Lin, Shu, & Lin, 2018) встановили, що *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 синтезує до 6,5 μ M ІОК (1,14 мкг/мл) в присутності 1 г/л триптофану. Також в культуральній рідині було знайдено й інші індольні сполуки: індол-3-етанол та індол-3-лактат, які є інтермедіатами синтезу ІОК. Для підтвердження функціонування ІІ-шляху дослідники визначили експресію генів *ipdC* та *iacH*, відповідальних за утворення ферментів даного шляху. Їх активність підвищувалася у 208 і 61 разів, відповідно, у присутності триптофану в середовищі порівняно з середовищем, яке містило піруват.

З філосфери салату було виділено штам *Pantoea agglomerans* C1 (Luziatelli та ін., 2020) і проаналізовано його геном на наявність ферментів, пов'язаних з біосинтезом ІОК (11 послідовностей). Аналіз виявив, що з усіх проаналізованих послідовностей наявні лише 3, які відповідають за синтез ферментів ІІ-шляху. Дослідники оптимізували умови культивування штаму, зокрема, підбираючи склад поживного середовища, джерело вуглецю та фізіологічний стан інокуляту. Так, максимальний рівень синтезу ІОК (263,33 мг/л) спостерігали при посіві 4-годинного інокуляту на середовище з сахарозою та 0,8 г/л триптофану.

Ран зі співавт. (Pan та ін., 2020) провели повне секвенування геному *Mycobacterium* Mya-zh01 і ідентифікували 7 генних послідовностей, що кодують гени, пов'язані з біосинтезом ІОК. Серед них 3 вказують на

імовірне функціонування ІІІ-шляху – індол-3-піруват монооксигеназа, індол-3-піруват декарбоксилаза та альдегід дегідрогеназа. Завдяки утворенню 16,18 мкг/мл ІОК в присутності 0,2 г/л триптофану штам *Mya-zh01* позитивно впливав на проростання саджанців та схожість насіння.

Фітопатогенні мікроорганізми. Як зазначалося раніше (Dusa, Lorgv, Patten, Rose, & Glick, 2014) синтез ІОК у великих кількостях може діяти як фактор патогенності у фітопатогенних бактерій та грибів.

У своїй роботі McClerklin зі співавт. дослідили, які шляхи синтезу ІОК функціонують у фітопатогенного штаму *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (McClerklin та ін., 2018). Так, при культивуванні штаму DC3000 на середовищі, яке містило цитрат, без внесення попередників штам утворював до 30,6 нг ІОК/мл. Однак при додаванні попередників (Trp, IAM, IAN, IPyA, TAM, or IAAld) було відмічено, що найбільша стимуляція синтезу відбувається в присутності індол-3-ацетальдегіду – утворюється до 500 разів більше ІОК порівняно з контролем (11,7 нг/мл).

1.1.2. Шлях через індол-3-ацетамід. Індол-3-ацетамідний шлях є другим триптофан-залежним шляхом біосинтезу індол-3-оцтової кислоти (рис. 1.2). Він менш поширений, так як притаманний лише деяким симбіотичним мікроорганізмам (Torres та ін., 2018), асоціативним (Lin, 2013; Liu, 2019; Upadhyay, 2008; Upadhyay, 2010) та переважній більшості фітопатогенів (Tsavkelova, 2012; Manulis, 1994; Lacroix, 2014; Huang, 2015; Aragón, 2014).

Схема синтезу ІОК *Agrobacterium tumefaciens* Ach5 (фітопатогенний штам) згідно KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), наведена на рис. 1.2.

A. tumefaciens Ach5 синтезує ауксини і цитокініни у кількостях, що призводять до утворення пухлин та втрати спеціалізованості (диференціювання) тканин рослин. Внаслідок цього виникають коронкові галі – пухлини-карциноми, які зустрічаються частіше за все у фруктових дерев (Huang та ін., 2015).

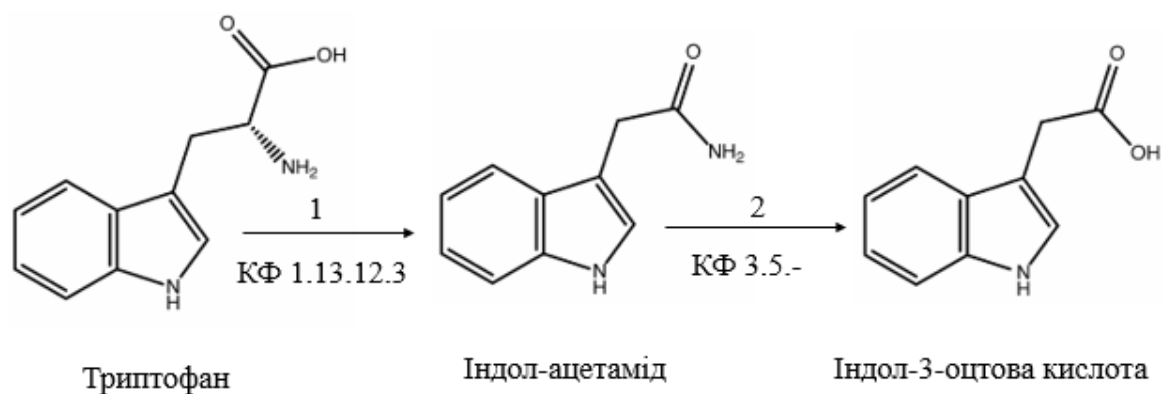


Рис. 1.2. Синтез індол-3-оцтової кислоти у *Agrobacterium tumefaciens* Ach5.

Ферменти біосинтетичного шляху: 1 – триптофан-2-монооксигеназа, 2 – індол ацетамід гідролаза

Симбіотичні азотфіксатори. В роботі (Torres та ін., 2018) дослідували ауксин-синетзувальну здатність азотфіксувальних бактерій *Bradyrhizobium elkanii* 5019 та *Bradyrhizobium japonicum* E109. Втім, кількість утвореної ІОК встановил усього 0,67 і 1515,17 нмоль/л відповідно, що є дуже невисоким показником. Про те, що у цих штамів функціонує ІАМ-шлях біосинтезу ІОК, свідчить те, що в геномі бактерії відсутні послідовність *ipdC*, яка кодує головний фермент індол-3-піруватного біосинтетичного шляху, і те, що в культуральній рідині наявний індол-3-ацетамід (0,3-0,55 нмоль/л). Також, за рахунок екзогенного внесення ІОК в середовищу культивування, збільшувалося накопичення біомаси та здатність до утворення екзополісахариду. Автори припускають, що це пов'язано зі стимуляцією механізму стресостійкості у цих ризобактерій, так як у відповідь на стресові фактори (засуха, солоність, перепади температур тощо) утворюється ІОК.

Ризосферні та ендоефітні мікроорганізми. У 2008 р. штам *Pseudomonas fluorescence* Psd (Upadhyay, & Srivastava, 2008) було виділено з ризосфери горошку чорного (*Vigna mungo*). Ці вчені пізніше (Upadhyay, & Srivastava, 2010) визначили, що штам *P. fluorescence* Psd, синтезує ІОК, а не лише антибіотики. Рівень синтезу ІОК був 80 мкг ІОК/ОГ (оптична густина

клітинної суспензії при довжині хвилі 600 нм) при вирощуванні штаму Psd на середовищі з 1 г/л триптофану та сукцинатом в якості джерела вуглецю.

В подальших своїх дослідженнях Kochar зі співавт. визначили, що досліджуваний штам *P. fluorescence* Psd синтезує ІОК індол-3-ацетамідним шляхом (Kochar, Upadhyay, & Srivastava, 2011). За надмірної експресії генів триптофан монооксигенази (*iaaM*) та індол-3-ацетамід гідролази (*iaaH*), які беруть участь в ІАМ-шляху, у штаму Psd утворювалося у 13 разів більше ІОК, яка також згубно вплинула на розвиток коренів сорго.

У роботах (Lacroix, 2014; Liu, 2019) дослідники знайшли в геномі різних мікроорганізмів геномні послідовності *iaaH* та *iaaM*, які кодують синтез ключових ферментів ІАМ шляху – амідази та триптофан 2-монооксигенази відповідно.

Lin зі співавт. (Liu та ін., 2019) ізолювали штам *Streptomyces* sp. En1 з листя тису китайського (*Taxus chinensis*). Цей штам при вирощуванні на триптон-соєвому бульйоні, який містив 1 г/л триптофану, синтезував ІОК. Втім, дослідники не розраховували кількісний вміст ІОК.

В 2019 р. автори роботи (Lacroix, Gizatullina, Babst, Gifford, & Citovsky, 2014) досліджували здатність до синтезу ауксинів штаму *Streptomyces* sp. NEAU-S7GS2, який був виділений з ризосфери та коренів сої (*Glycine max*), а також його дію на ріст рослин. За умов росту штаму на середовищі з 1 г/л триптофану він утворював до 17,5 мкг/мл ІОК. Так, за передпосівної обробки насіння кукурудзи культуральною рідиною штаму NEAU-S7GS2 довжина кореня, його свіжа і суха маса збільшувалася на 55,9, 107,9 і 151,7% відповідно.

Фітопатогенні мікроорганізми. Актинобактерії роду *Streptomyces* становлять велику групу мікроорганізмів, які утворюють ІОК через ІАМ шлях (Lacroix, 2014; Liu, 2019; Manulis, 1994; Sousa, 2016; Spaeren, 2007). На бульбах картоплі (*Solanum tuberosum*) фітопатогени роду *Streptomyces*: *S. violaceus* 44 і *S. griseus* 20, а також *S. exfoliatus* RL 830103 й *S. scabies* RL 840170, виділені з парші картоплі, спричиняють на ній коркові ураження

(Manulis, Shafrir, Epstein, Lichter, & Barash, 1994). Крім того, серед представників родів *Agrobacterium* (Huang та ін., 2015), *Pseudomonas* (Aragón, Pérez-Martínez, Moreno-Pérez, Cerezo, & Ramos, 2014), а також у мікроскопічних грибів роду *Fusarium* (Tsavkelova та ін., 2012) спостерігається функціонування ІАМ-шляху синтезу ІОК.

В огляді (Sousa, & Olivares, 2016) вченими було підсумовано доступну інформацію від початку ХХ ст. та до 2016 р., яка стосується певних властивостей метаболітів, продукованих стрептоміцетами, та їх застосування в практиці сільського господарства. Аналіз геному збудника парші картоплі *Streptomyces scabiei* показав наявність кодуєчих послідовностей *iaaM/iaaH*, участь яких у біосинтезі ІОК було підтверджено шляхом руйнування генів (Legault, Lerat, Nicolas, & Beaulieu, 2011). Зокрема було зазначено, що клітини *S. scabiei* у присутності 10 mM (2 г/л) триптофану продукували індол-3-оцтову кислоту у високих концентраціях (1,1 мг/г сухої біомаси (СБ)). Як зазначають автори, при подальшому пошуку інгібіторів такстоміну А, який викликає ураження картоплі, утворення ІОК фітопатогенними *S. scabiei* може сприяти покращенню росту рослин.

В роботі (Aragón, Pérez-Martínez, Moreno-Pérez, Cerezo, & Ramos, 2014) встановлено, що *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335, який є збудником вузлового захворювання рослин Маслини європейської (*Olea europaea*), утворював до 5,56 мг ІОК/г СБ за умови культивування на триптоні. При видаленні оперону *iaaM/iaaH* рівень синтезу ІОК зменшився у 40 разів, що свідчить про роль ІАМ-шляху у синтезі ауксинів у штаму NCPPB 3335. Зауважимо, що даний штам синтезує ІОК у дуже високих кількостях без екзогенного внесення триптофану або індол-3-ацетаміду в середовище культивування, що робить його один з найперспективніших процентів ІОК серед всіх проаналізованих вище літературних джерел.

Tsavkelova зі співавт. досліджували представників роду *Fusarium* та їх ауксин-синтезувальну здатність (Tsavkelova та ін., 2005). Було визначено, що при культивування штаму *Fusarium proliferatum* ET1 на середовищі з

сахарозою та 0,8 г/л триптофану досягадался найвища концентрація ІОК (13,8 мг/л). Також дослідники сконструювали рекомбінантний штам *Fusarium fujikuroi* #T2, перенесши *iaaM* та *iaaH* гени від *F. proliferatum* ET1. Так, одержаний рекомбінантний штам утворював 255,6 мг/л ІОК.

Огляд літературних джерел показав, що ІАМ-шлях синтезу індол-3-оцтової зустрічається у асоційованих з рослинами бактерій (симбіотичних азотфіксаторів, ризосферних, ендofітних), а також фітопатогенних мікроорганізмів. ІАМ-шляху біосинтезу ауксинів присвячена велика кількість робіт, зокрема дослідники аналізують геном мікроорганізмів, що синтезують ІОК, та пробують регулювати синтез ІОК різними шляхами, у тому числі створюючи рекомбінантні штами, тому він є добре вивченим на теперішній день.

1.1.3. Шлях через індол-3-ацетонітрил. Синтез ІОК через індол-3-ацетонітрил притаманний переважно вищим рослинам, проте невелика кількість повідомлень (Luo, 2016; Sun, 2018) присвячена біосинтезу ІОК через ІАН мікроорганізмами.

На рис. 1.3 наведено схему біосинтезу індол-3-оцтової кислоти.

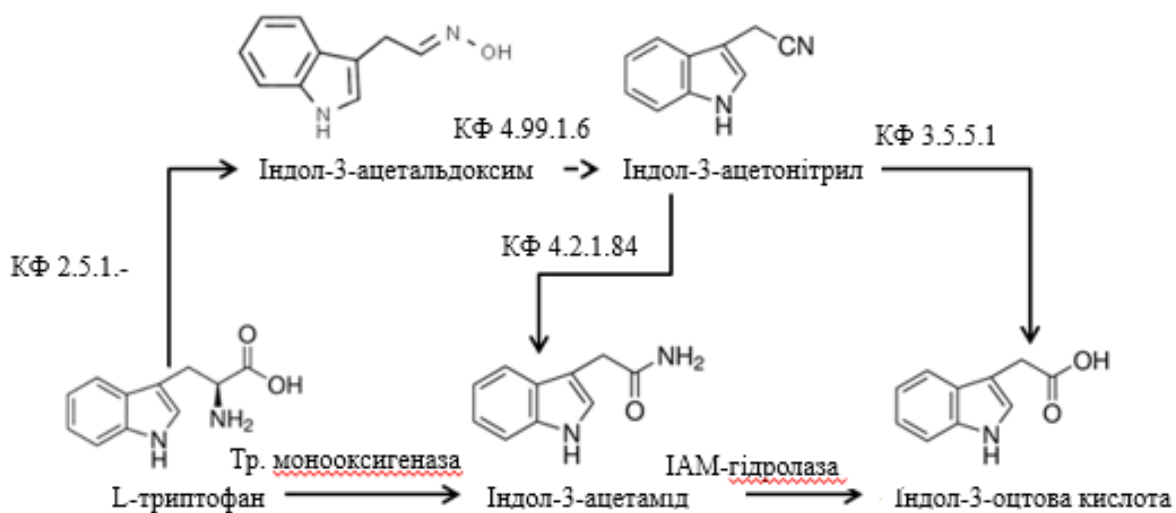


Рис. 1.3. Хімічні перетворення під час біосинтезу ІОК через індол-3-ацетонітрил

Триптофан окиснюється до індол-3-ацетальдоксиму під дією N-гідроксил-триптамін оксидоредуктази (КФ 2.5.1.-), потім від нього

внаслідок взаємодії з індолацетальдоксим дегідратазою (КФ 4.99.1.6) відщеплюється вода, а під дією нітрилази (КФ 3.5.5.1) утворений індол-3-ацетонітрил перетворюється в ІОК. Більше того, в окремих випадках перетворення індол-3-ацетонітрилу в ІОК може відбуватися також і через індол-3-ацетамід (КФ 4.2.1.84 – нітрил гідратаза α -субодиниця).

В 2016 році вперше було опубліковано повідомлення (Luo та ін., 2016) про функціонування ІАН-шляху біосинтезу ІОК представниками *Fusarium* spp. При культивуванні штаму *Fusarium graminearum* DAOM 233423 на поживному середовищі з карбоксиметилцелюлозою у присутності 0,2 mM індол-3-ацетонітрилу як попередника синтезу досягалася максимальна концентрація ІОК (до 31,5 мкг/мл).

В роботі (Sun та ін., 2018) було встановлено, що штам *Variovorax boronicumulans* CGMCC 4969, виділений з ризосфери, здатний до синтезу 0,26 г/л ІОК при вирощуванні на середовищі з 0,1 г/л індол-3-ацетонітрилу. Так, дослідниками було визначено, що ІАН є прекурсором синтезу ІОК у бактерій *V. boronicumulans* CGMCC 4969, а індол-3-ацетамід є інтермедіатом цього біосинтетичного шляху.

В сучасній літературі наявні нечисельні дані щодо того, чи функціонує ІАН-шлях у мікроорганізмів, що свідчить про його маловивченість. Це вказує на необхідність проведення подальших досліджень ІАН-шляху, щоб зрозуміти всі етапи синтезу ІОК і механізми її регуляції.

1.1.4. Генетично модифіковані продуценти індол-3-оцтової кислоти. Для створення організмів з потрібними властивостями найчастіше застосовують методи генетичної інженерії. Так само це стосується і одержання надсинтетиків індол-3-оцтової кислоти.

ІІІ-шлях. Для біосинтезу ІОК з L-триптофану через індол-3-піруватний шлях потрібні три ферменти: амінотрансфераза, яка перетворює L-триптофан в ІІІ-кислоту, індол-3-піруватдекарбоксилаза, яка здійснює декарбоксилювання індол-3-пірувіноградної кислоти до індол-3-ацетальдегіду, та індол-3-ацетатдегідрогеназа, яка відповідає за окиснення

індол-3-ацетальдегіду до ІОК. У роботах (Guo, 2019; Kim, 2019) вихідні штами не були здатні до синтезу фітогормонів ауксинової природи, тому індол-3-піруватний шлях синтезу ІОК в геномі реципієнтів було створено *de novo* шляхом вбудовування генів, що кодують відповідні ферменти.

Guo зі співавт. (Guo, Kong, Chu, Li, & Pan, 2019) було сконструйовано генно-модифікований штам *Escherichia coli* DG121, який був здатний до синтезу ІОК на рівні 387 мг/л за наявності 0,5 г/л триптофану. Процес генетичної модифікації складався з трьох генних продуктів, саме: амінотрансфераза ARO8 від *Saccharomyces cerevisiae*, декарбоксилаза KDC та послідовність генів *E. coli aldH*.

Для встановлення біологічного шляху біосинтезу ІОК у *C. glutamicum* ATCC 13032 (Kim, Kwak, Kim, & Lee, 2019) було використано гени *aspC*, *ipdC* та *iad1* від *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* та *Ustilago maydis*, які експресувалися під контролем промоторів *tac*, *ilvC* та *sod*. Кінцевий генно-інженерний штам при культивуванні на триптоні у присутності 10 г/л триптофану утворював 2,3 г/л ІОК в колбі та 7,3 г/л ІОК у 5-літровому ферментері.

ІАМ-шлях. У 2020 р. Wu зі співавт. (Wu та ін., 2021) шляхом цільноклітинного каталізу розробили та вбудували два шляхи біосинтезу ІОК в *E. coli* MG165 – через триптамін та через індол-3-ацетамід. Так, при культивуванні штаму MIA-6, що містив ІАМ-шлях, на середовищі з глюкозою та 10 г/л триптофану вдалося досягти синтезу ІОК на рівні 7,1 г/л. У той же час штам MTAI-5, у якого функціонував ТАМ-шлях, концентрація ІОК була у 98,4 разів меншою (<0,1 г/л).

Отже, з описаних вище робіт можна зробити такі висновки. По-перше, індол-3-піруватний шлях синтезу ІОК є притаманним для переважної більшості ґрунтових бактерій. По-друге, для регуляції утворення уксинів існує варіант регуляції експресії генів, які кодують синтез потрібних ферментів. В табл. 1.1. підсумовано дані щодо шляхів біосинтезу ІОК.

Дані, наведені у табл. 1.1, показують, що високі концентрації ІОК (від 260 до 1130 мкг/мл ІОК серед природних штамів) утворюються мікроорганізмами, у яких триптофан залучається до метаболізму через індол-3-піруват. У той же час генетична модифікація бактерій дає змогу одержати штами-надсинтетики, які утворюють до 7,3 г/л ІОК (Kim, Kwak, Kim, & Lee, 2019). Індол-3-ацетамідний та індол-3-ацетонітрильний шляхи є менш поширеними та здебільшого функціонують в ендofітних та фітопатогенних мікроорганізмів.

1.2. Підходи до інтенсифікації продукування індол-3-оцтової кислоти

Активне дослідження та підвищення інтересу до мікробних фітогормонів почалося з кінця 90-х рр. XX століття. Починаючи від 2010-х років вчені навчилися регулювати формування фітогормонів, власне ІОК, шляхом зміни різних умов культивування, заміни джерела вуглецю або внесення екзогенного попередника біосинтезу – триптофану.

Зараз існує два шляхи впливу на біосинтез мікробної ІОК:

1. Прямий – за рахунок додавання триптофану в середовище культивування мікроорганізмів відбувається підвищення кількості утвореної ІОК (Ambawade, 2015; Bose, 2016; Costacurta, 1995; Jeyanthi, 2013; Kumari, 2018; Lin, 2013; McClerklin, 2018; Naveed, 2015; Nutaratat, 2017; Ozdal, 2017; Shim, 2015; Wagi, 2019).
2. Опосередкований – на синтез ІОК впливають біотичні та абіотичні стресові фактори. Такий шлях інтенсифікації можливий в ризобактерій, асоційованих з рослинами (Chandra, 2018; Hasuty, 2018; Molina, 2018; Ouyang, 2017).

Таблиця 1.1 – Групи мікроорганізмів, що синтезують індол-3-оцтову кислоту

Продуцент	Ґрунтові мікроорганізми	Джерело карбону	Триптофан, г/л	Кількість ІОК, мкг/мл	Література
Індол-3-піруватний шлях					
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	Симбіотичні	Декстроза	0,1	33,03	Imada, 2017
<i>Enterobacter</i> sp. A3CK	Ризосферні	Манітол L-аспарагін	1,0	430,0	Ghosh, 2015
<i>Enterobacter xiangfangensis</i> BHW6	Ризосферні	Триптон	15	1130,0	Zhang, 2020
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5	Ризосферні	Глюкоза Гліцерол	0,1	13,1	Rodrigues, 2016
<i>Pantoea</i> sp. YR343	Ризосферні	Глюкоза	0,2	н.в.	Estenson, 2018
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	Ризосферні	Глюкоза Малат	0,1	5,73	Rivera, 2018
<i>Azospirillum brasilense</i> Az39				6,09	
<i>Azospirillum brasilense</i> Cd				6,27	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Ризосферні	Гліцерол	1,0	1,14	Lin, 2018
<i>Pantoea agglomerans</i> C1	Філософерний	Сахароза	0,8	263,33	Luziatelli, 2020

Продуцент	Ґрунтові мікроорганізми	Джерело карбону	Триптофан, г/л	Кількість ІОК, мкг/мл	Література
<i>Mycobacterium</i> Mya-zh01	Ендофіт	Картопляне борошно	0,2	16,18	Pan, 2020
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	Фітопатогени	Цитрат натрію	—	0,03	McClerklin, 2018
<i>Escherichia coli</i> DG121	Вільноіснуючі	Глюкоза	0,5	387,0	Guo, 2019
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	Вільноіснуючі	Триптон	10,0	7300	Kim, 2019
Індол-3-ацетамідний шлях					
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109	Симбіотичні	Манітол	0,01	$1,17 \cdot 10^{-4}$	Torres, 2018
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> 5019		Манітол	0,01	$2,65 \cdot 10^{-4}$	
<i>Pseudomonas fluorescence</i> Psd	Ризосферні	Сукцинат	1,0	80 мкг ІОК/ОГ ^a	Upadhyay, 2010
<i>Streptomyces</i> sp. En1	Ендофіти	Триптон	1,0	н.в.	Liu, 2019
<i>Streptomyces</i> sp. NEAU-S7GS2	Ендофіти	Триптон	1,0	17,5	Lacroix, 2014
<i>Escherichia coli</i> MG165	Вільноіснуючі	Глюкоза	10,0	7100	Wu, 2021
<i>Streptomyces scabiei</i>	Фітопатогени	Целобіоза	2,0	1,1 мг/г СБ ^б	Legault, 2011

Продуцент	Ґрунтові мікроорганізми	Джерело карбону	Триптофан, г/л	Кількість ІОК, мкг/мл	Література
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> NCPPB 3335	Фітопатогени	Триптон	—	5,56 мг/г СБ ^б	Aragón, 2014
<i>Fusarium proliferatum</i> ET1	Фітопатогени	Сахароза	0,8	13,8	Tsavkelova, 2012
<i>Fusarium fujikuroi</i> #T2	Фітопатогени	Сахароза	0,8	255,6	
Індол-3-ацетонітрильний шлях					
<i>Variovorax boronicumulans</i> CGMCC 4969	Ризосферні	Триптон	—	2,61·10 ⁵	Sun, 2018
<i>Fusarium graminearum</i> DAOM 233423	Фітопатогени	Карбоксиметил целюлоза	—	31,5	Luo, 2016

Примітка. ^а – оптична густина; ^б – суха біомаса; н.в. – концентрацію індол-3-оцтової кислоти не визначали; «—» – в середовище культивування не вносили триптофан;

1.2.1. Внесення у середовище попередника біосинтезу. У 1995 р. бельгійськими вченими (Costacurta, & Vanderleyden, 1995) одними з перших було опубліковано роботу щодо інтенсифікації синтезу ауксинів шляхом додавання попередника біосинтезу в культуральне середовище. З того часу питання підвищення синтезу фітогормонів лише збільшило свою актуальність, тому хочемо розглянути роботи сучасних авторів.

Протягом 2013–2019 рр. було опубліковано інформацію про утворення ауксинів як асоційованими з рослинами бактеріями (Ambawade, 2015; Bose, 2016; Jeyanthi, 2013; Nutaratat, 2017; Ozdal, 2017) так і не асоційованими (McClerklin, 2018; Myo, 2019).

Інтенсифікація синтезу індол-3-оцтової кислоти бактерій, які асоційовані з рослинами. Інтерес світових вчених до продуцентів ІОК був зумовлений тим, що фітогормони, синтезовані асоційованими мікроорганізмами, були рівнозначні за функціями до гормонів, синтезованих рослинами.

Ризосферні мікроорганізми. Найбільша кількість публікацій (Ambawade, 2015; Bose, 2016; Jeyanthi, 2013; Lin, 2013; Naveed, 2015; Nutaratat, 2017; Ozdal, 2017; Shim, 2015; Wagi, 2019) присвячена ризосферним бактеріям, які синтезують фітогормони, зокрема ІОК.

Автори роботи (Wagi, & Ahmed, 2019) визначили, що штам *Bacillus cereus* So3II b, який був виділений з ризосфери чорного пасльону (*Solanum nigrum*), утворював 23,3 мг/л ІОК при культивуванні на середовищі без триптофану, а при внесенні прекурсора синтез збільшувався в 3 рази (до 70,0 мг/л). Втім, автори не вказували концентрацію триптофану, яка призвела до утворення ауксинів у такій кількості. Проте відомо, що його вносили доволі багато (5–40 мг/мл). Слід зазначити, що штаму *B. cereus* So3II був притаманний значно вищий рівень синтезу ІОК, на відміну від штаму *S. fradiae* NKZ-259 (Myo та ін., 2019), навіть при вирощуванні штаму на середовищі без триптофану.

У роботі (Kumari, Prabha, Singh, Kumari, & Kiran, 2018) зазначено, що кількість ІОК, яка була синтезована *Bacillus subtilis* DR2 (асоційований з *Eragrostis cynosuroides*), підвищувалася майже в 1,2 рази (до 168,1 мкг/мл) у присутності 1,2 г/л триптофану і з використанням триптонку як джерела вуглецю.

Naveed зі співавт. встановили, що при додавання триптофану в середовище культивування *Burkholderia phytofirmans* PsJN концентрація ІОК зростала з 0,74 мкг/мл до 12,78 мкг/мл (Naveed та ін., 2015).

З забрудненої важкими металами ризосфери рослин, що ростуть біля покинутої шахти, було виділено штам бактерій *Bacillus* sp. JH 2-2 (Shim, Kim, Shea, & Oh, 2015), який у присутності 0,5 г/л триптофану утворював 5,9 мкг/мл ІОК, в той час при його відсутності в культуральній рідині штаму JH 2-2 ауксини не були виявлені.

В роботах (Lin, 2013; Bose, 2016; Jeyanthi, 2013; Ozdal, 2017) автори не наводили даних щодо утворення ІОК ризосферними мікроорганізмами за відсутності триптофану. Тому залишається невідомим, наскільки було інтенсифіковано синтез цього ауксину.

Наприклад, Jeyanthi і Ganesh встановили, що додавання 0,5 г/л триптофану в середовище *Pseudomonas fluorescence* sp. призвело до утворення 58 58 мкг/мл ауксинів в стаціонарній фазі росту (Jeyanthi, & Ganesh, 2013). Також автори відмітили, що при збільшенні кількості триптофану до 0,6 г/л концентрація ауксинів зменшувалася на 8 мкг.

Автори роботи (Bose, Kher, Nataraj, & Keharia, 2016) зазначали, що ризосферний (виділений з тропічної бобової рослини *Teramnus labialis* (L.f.) Spreng) штам *Enterobacter cloacae* SN19 у присутності 1 г/л триптофану синтезував ІОК в концентрації 382,23 мкг/мл.

Ozdal зі співавт. з виділили штам *Arthrobacter agilis* A17 з ризосфери (Ozdal, Ozdal, Sezen, Algur, & Kurbanoglu, 2017). Цей штам утворював 75 мкг/л ІОК при культивуванні на середовищі з 1 г/л триптофану. Також вчені

проводили іммобілізацію клітин штаму A17 в шарі альгінату, внаслідок чого кількість ІОК підвищилася до 520 мг/л.

У 2020 р. Lebrazi зі співавт. оптимізували умови культивування чотирьох ризосферних бактерій (*Phyllobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Agrobacterium* sp., та *Rhizobium* sp.) для одержання максимального синтезу ІОК. Було визначено, що для досягнення максимального синтезу ІОК в середовищі з манітолом повинно знаходитись 2 г/л триптофану. В таких умовах *Rhizobium* sp. утворював найбільшу кількість ІОК (116,42 мкг/мл проти 90,21 мкг/л без триптофану) серед усіх аналізованих мікроорганізмів (Lebrazi та ін., 2020).

Ендофіти. Вченими з Таїланду (Dasri, Kaewharn, Kanso, & Sangchanjiradet, 2014) з коренів епіфітної орхідеї (*Dendrobium pulchellum*) виділили невідомий штам під номером DPY-05, який синтезував ІОК в кількості 67,18 мкг/мл (за наявності 0,5 г/л триптофану), що майже в 27 разів вище, ніж без внесення попередника біосинтезу (2,5 мкг/мл).

Філософерні бактерії. Показано, що клітини штаму *Enterobacter* sp. DMKU-RP206, які були виділені поверхні листя рису і які вирощували на середовищі з лактозою й триптофаном (вміст 11 г/л), утворювали 5,56 г/л індол-3-оцтової кислоти, що в 13,4 рази перевищувало значення, одержані при культивуванні без попередника (Nutaratat, Monprasit, & Srisuk, 2017).

Інтенсифікація синтезу індол-3-оцтової кислоти мікроорганізмами, які неасоційовані з рослинами. Вільноживучі бактерії, тобто ті, які безпосередньо не беруть участі у розвитку рослин, також здатні до синтезу фітогормонів (McClerklin, 2018; Mon Myo, 2019).

В роботі (McClerklin та ін., 2018) досліджували штам *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, який є збудником плісності рослин, і його здатність до утворення ІОК. Так, штам синтезував до 2,76 мкг/л ІОК на середовищі, яке містить 0,05 г/л триптофану. Також було відмічено, що кількість ІОК

збільшується до 14,1 мкг/л при додаванні 0,05 г/л індол-3-пірувату замість триптофану.

Так, Mon Myo із співавт. встановили, що на середовищі з триптофаном (2 г/л) продуцент неоміцину *Streptomyces fradiae* NKZ-259 утворював ІОК у концентрації 82,363 мг/л, що в 20 разів більше, ніж на середовищі без триптофану (4,876 мг/л) (Mon Myo та ін., 2019).

На нашу думку, синтез індол-3-оцтової кислоти у мікроорганізмів, описаних вище (McClerklin, 2018; Mon Myo, 2019), у зв'язку з їх способом існування та кількістю синтезованої ІОК, може виступати як один з механізмів захисту бактерій за негативних умов довкілля. Зокрема, в роботі (Lin, Shu, & Lin, 2018) вчені встановили, що присутність ендогенної ІОК сприяє виживання клітин в стресових умовах, а наявність екзогенної – росту клітин.

Синтез індол-3-оцтової кислоти в еукаріотів під впливом триптофану. Шляхи біосинтезу ІОК у бактерій є найбільш детально вивченими, натомість утворенню фітогормонів у грибів і дріжджів присвячена зовсім невелика кількість робіт (Bunsangiam, 2019; Feoktistova, 2016; Fu, 2016; Nutaratat, 2016).

В роботі (Nutaratat, Srisuk, Arunrattiyakorn, & Limtong, 2016) було зазначено, що дріжджі *Rhodospiridium paludigenum* DMKURP301, виділені з філосфери рису, утворював до 1,33 г/л ІОК при внесенні 5 г/л триптофану. В ту ж саму чергу на середовищі без попередника не було виявлено ІОК.

Fu із співавт. опублікували роботу (Fu та ін., 2016) в якій зазначали, що штами *Aureobasidium pullulans*, виділені з філосфери росички, утворювали 56–610 мг/л ІОК за наявності 1 г/л триптофану. За відсутності попередника кількість ІОК була майже в три рази менше і була в діапазоні 9-236 мг/л.

Бактерії *Rhodospiridiobolus fluvialis* DMCU-CP293, виділені з філоплану кукурудзи, на пептоно-декстросовому середовищі (YPD) вприсутності 1 г/л триптофану синтезував до 1,06 г/л ІОК, в той час як за відсутності попередника в середовищі культивування ауксинів не було виявлено (Bunsangiam та ін., 2019).

У табл. 1.2. підсумовано дані щодо підвищення синтезу ІОК у мікроорганізмів. З цієї таблиці видно, що найвищу концентрації ІОК (5,56 г/л) синтезуює штам *Enterobacter* sp. DMKU-RP206. Спираючись на такі результати можна розглядати цей штам як перспективного продуцента ІОК для розробки технології її одержання. Аналізуючи літературні дані, можна зробити висновок, що еукаріоти синтезують значно вищі кількості ІОК, ніж бактерії (Bunsangiam, 2019; Fu, 2016; Nutaratat, 2016). Винятком є штам *Enterobacter* sp. DMKU-RP206 (Nutaratat, Monprasit, & Srisuk, 2017), який утворює декілька г/л ІОК, однак це можна пояснити наявністю в середовищі дуже великої концентрації триптофану (11 г/л). Надсинтез ІОК еукаріотами, на нашу думку, пов'язаний з морфологією клітин дріжджів та грибів. Наявність ядра та розвиненого синтетичного апарату дає змогу утворювати більшу кількість ферментів для біосинтезу вторинних метаболітів, що відповідно приводить до утворення високих концентрацій ауксинів.

1.2.2. Вплив інших факторів на синтез індол-3-оцтової кислоти у бактерій. На ріст асоційованих з рослинами бактерій, а також на їх ауксин-синтезувальну здатність, можуть впливати як абіотичні, так і біотичні фактори стресу, а також рослинні сигнальні молекули, які відповідають за реакцію рослин на негативні умови довкілля (Molina та ін., 2018). Це можна пов'язати з тим, що ІОК володіє властивістю впливати на ріст і розвиток кореня, таким чином підвищуючи його чутливість до поживних речовин і води, а також вона бере участь у формуванні стійкості до умов засухи, осмотричного і теплового шоку (Kudoyarova та ін., 2019).

Таблиця 1.2 – Інтенсифікація синтезу індол-3-оцтової кислоти під впливом триптофану

Продуцент ІОК	Джерело карбону	Триптофан в культуральному середовищі, г/л	Концентрація ІОК, мкг/мл		Література
			До інтенсифікації	Після інтенсифікації	
Мікроорганізми, асоційовані з рослинами					
<i>Bacillus cereus</i> So3II b	Глюкоза	30 мг/мл	23,3	70,0	Wagi, 2019
Штам DPY-05	Пептон Гліцерин	0,5	2,5	67,18	Dasri, 2014
<i>Bacillus subtilis</i> DR2	Триптон	1,2	100,3	168,1	Hasuty, 2018
<i>Enterobacter</i> sp. DMKU-RP206	Лактоза	11,0	415	5560	Nutaratat, 2017
<i>Rhizobium</i> sp.	Манітол	2,0	0,116	0,09	Lebrazi, 2020
<i>Bacillus</i> sp. JH 2-2	Сахароза	0,5	0	5,9	Shim, 2015
Мікроорганізми, неасоційовані з рослинами					
<i>Streptomyces fradiae</i> NKZ-259	Крохмаль	2,0	4,876	82,363	Mon Myo, 2019
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	Лимонна кислота	0,05	0,03	2,76	McClerklin, 2018
Еукаріоти					
Штами <i>Aureobasidium pullulans</i>	Пептон Декстроза	1,0	9-236	56-610	Fu, 2016
<i>Rhodospiridiobolus fluvialis</i> DMCU-CP293	Пептон Декстроза	1,0	0	1062	Bunsangiam, 2019
<i>Rhodospiridium paludigenum</i> DMKURP301	Сахароза	5,0	0	1330	Nutaratat, 2016

Примітка. н.в. – не визначали;

Абсцизова, саліцилова та жасмонова кислоти відносяться до рослинних сигнальних молекул. Переважно вони утворюються у відповідь на абіотичні фактори стресу (солоність, висока температура, засуха і присутність важких металів) (Kolupaev, 2016; Kudoyarova, 2019). У відповідь на біотичні фактори стресу в заражених фітопатогенами тканинах рослин утворюється білок NPR1, який запускає механізм синтезу PR (pathogenesis-related) білків (глюканаз, хітиназ та інгібіторів протеаз) (Kolupaev, Karpets, Yastreba, & Lugovaya, 2016).

Наявні літературні дані, що за несприятливих умов навколишнього середовища (зміна температури, рН, висока солоність), а також у присутності саліцилової і жасмонової кислот (антагоністи ІОК), може спостерігатися підвищений синтез ауксинів для деяких ризосферних бактерій (Chandra, 2018; Hasuty, 2018; Molina, 2018; Ouyang, 2017).

В роботі (Chandra, Askari, & Kumari, 2018) автори визначили, що зміна рН впливає на синтез індол-3-оцтової кислоти у трьох PGPR-штамів (CA2004, CA2003 та CA1001), які були виділені з ризосфери стевії медової. Концентрація ІОК, синтезованої штамом CA1001, при підвищенні рівня рН з 7 до 9 збільшувалася з 65 мкг/мл до 91,7 мкг/мл відповідно. Hasuty зі співавт. встановили, що штам бактерій *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* KB05 утворює високу концентрацію ІОК (56,6 мкг/мл) в стресових умовах ($t=40^{\circ}\text{C}$, рН 9,0) за присутності триптофану (Hasuty, Choliq, & Hidayat, 2018). Отримані в ході дослідження показники були в 8 рази вищі, ніж при культивуванні цього штаму при рН 7,0 та температурі 30°C (7 мкг/мл).

В роботі (Molina та ін., 2018) досліджували штами *Azospirillum brasilense* Sp245 та *A. brasilense* Az39 та вплив біотичних і абіотичних факторів на їх ауксин-синтезувальну здатність. Зокрема, спостерігали вплив високої температури 45°C , солоності, наявності в середовищі культивування абсцизової кислоти і хітозану, а також вплив супернатанту фітопатогенів *Pseudomonas savastanoi* та *Fusarium oxysporum*, різних

концентрації саліцилової кислоти та метил жасминової кислот. При вивченні дії абіотичних факторів було встановлено, що присутність 0,02 г/л абсцизової кислоти сприяла підвищенню концентрації ІОК у обох штамів (+12,1% і 11,2% відповідно). Рівень експресії гену *ipdC* при цьому був більше на 10,7% і 17,2%, ніж варіанті контролю. Серед біотичних факторів для штаму Sp245 найкращий синтез спостерігали за внесення в середовище культивування 0,01% хітозану – концентрація ІОК підвищувалася в 1,12 разів відносно контролю. У штаму Az39 на синтез ІОК однаково впливали як хітозан, так і супернатант *F. oxysporum* (4% від об'єму) – концентрація ауксину збільшувалась на 4%.

В умовах вмісту невисокої кількості азоту (0,2 г/л $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) в середовищі культивування (абіотичного стрес) концентрація ІОК, синтезованої *Serratia* sp. ZM, яка була виділена з ризосфери тополі євфратської (*Populus euphratica*), збільшувалася до рівня 82 мкг/мл. У випадку відсутності стресових факторів, коли концентрація азоту збільшилася до 1,2 г/л, покращувалося накопичення біомаси, проте концентрація ауксинів була нижчою (OuYang, Pei, & Xu, 2017).

В табл. 1.3 підсумовано дані щодо впливу умов культивування на продукування ІОК у бактерій.

Отже, автори наведених вище робіт встановили, що при збільшенні температури і/або рН можна підвищити кількість ІОК. Втім, варто відмітити, що за такого способу інтенсифікації неможливо одержати високі кількості ІОК.

Таблиця 1.3 – Інтенсифікація синтезу фітогормонів ауксинової природи в умовах стресу

Мікроорганізм	Джерело карбону	Умови культивування продуцентів	Кількість ІОК, мкг/мл		Література
			Без стресового фактора	В умовах стресу	
Штам CA1001	Пептон	pH 9,0	65	91,7	Chandra, 2018
<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> KB05	Триптон	t=40°C, pH 9,0	7,0	56,6	Hasuty, 2018
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 (pFAJ64)	Малат	0,02 г/л абсцизової кислоти	4,71	5,29	Molina, 2018
		0,01% хітозану	5,65	6,34	
<i>Azospirillum brasilense</i> Az39 (pFAJ64)	Малат	0,02 г/л абсцизової кислоти	4,87	5,47	
		4% супернатанту <i>F. oxysporum</i>	5,98	6,21	
		0,01% хітозану	5,98	6,208	
<i>Serratia</i> sp. ZM	Глюкоза	0,2 г/л CO(NH ₂) ₂	–	82,0	Ouyang, 2017

Примітки. – не визначали;

Висновки до розділу 1

Згідно проаналізованих наукових праць можна зробити висновок, що різні групи мікроорганізмів здатні до синтезу ІОК. Дослідженню біосинтезу ІОК саме бактеріями, асоційованими з рослинами, присвячено найбільшу кількість робіт.

Розуміння шляхів синтезу ауксинів дає змогу дослідникам розкрити нові підходи і перспективи для інтенсифікації утворення ІОК. Перш за все, не лише триптофан може бути попередником синтезу, але й інші сполуки, які наявні у метаболічних шляхах цих мікроорганізмів, зокрема – індол-3-ацетонітрильний шлях індол-3-ацетамідний шлях, індол-3-піруватний шлях. Крім того, завдяки знанням щодо геномних послідовностей, які кодують синтез ключових ферментів, можна підвищувати експресію потрібних генів (Rivera та ін., 2018) і створювати рекомбінантні штамми, які утворюють надкількості ІОК (Guo, 2019; Kim, 2019; Wu, 2021). Третій підхід до інтенсифікації ІОК – це вплив стресових факторів на ризобактерії. Втім, слід згадати про недоліки цього методу порівняно з іншими: індивідуальний підхід для кожного штаму, низька ефективність, складність реалізації високомасштабної технології.

Зараз найбільш розповсюдженим шляхом інтенсифікації синтезу ІОК є додавання в культуральне середовище попередника біосинтезу. *Enterobacter* sp. DMKU-RP206 (Nutaratat, Monprasit, & Srisuk, 2017) синтезує до 5,56 г/л з використанням триптофану як попередника синтезу, що робить його одним з найперспективніших продуцентів ІОК. У той же час інші ауксин-синтезувальні мікроорганізми здатні до продукування індол-3-оцтової кислоти у концентраціях від декількох мкг/л до одного г/л.

Сучасні можливості генетичної інженерії та біотехнології дають змогу дослідникам врегулювати синтез ІОК та створити таких продуцентів ІОК, з використанням яких можна буде реалізувати технологію одержання ауксину на основі мікробного синтезу у промислових масштабах.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Об'єкти досліджень

У роботі використовували наступні об'єкти досліджень: виділені нами з забруднених нафтою зразків ґрунту штами *Nocardia vaccinii* К-8, *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 і *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 і, які були задепоновані в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Відповідні номери: ІМВ Ас-5017, ІМВ В-7241 і ІМВ В-7405.

Для визначення антимікробної активності поверхнево-активних речовин як тест-культури використовували фітопатогенні бактерії, які знаходяться в Українській колекції мікроорганізмів (УКМ): *Pseudomonas syringae* УКМ В-1027, *Agrobacterium tumefaciens* УКМ В-1000, *Pectobacterium carotovorum* УКМ В-1075, *Xanthomonas vesicatoria* УКМ В-1106, а також штами з колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та вірусології імені Заболотного НАН України: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ІМВ В-10₂, і *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ІМВ В-9167.

2.2. Культивування продуцентів поверхнево-активних речовин

Штам *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 культивували у середовищі, яке складалося з (г/л): нітрат натрію (NaNO_3) – 0,5–1,25; KH_2PO_4 – 0,1; хлорид кальцію 2-водний ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) – 0,1; гептагідрат сульфату магнію ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 0,1; сульфату заліза 7-водний ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 0,001; дріжджовий автолізат – вносили в об'ємі 0,5 %. Джерелом вуглецю та енергії були рафінована олія і відпрацьована олія після смаження картоплі «фрі» або м'яса соняшникова олія, об'ємна концентрація якої була 2 %.

Культивування бактерій *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 проводили в рідкому поживному середовищі (г/л): нітрат натрію (NaNO_3) – 1,3, хлорид натрію (NaCl) – 1,0, гідрофосфат натрію (Na_2HPO_4) – 0,6, сульфат магнію 7-

водний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 0.1, дигідрофосфат калію (KH_2PO_4) – 0.14, сульфат феруму 7-водний ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 0.001, рН на рівні 6.8–7.0. Джерелом вуглецю та енергії були етанол, а також олія, відпрацьована після смаження м'яса, концентрація якої становила 2 % (об'ємна частка).

A. calcoaceticus IMB B-7241 вирощували в середовищі наступного складу (г/л): хлорид натрію (NaCl) – 1.0, сечовина ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) – 0.35, гідрофосфат натрію (Na_2HPO_4) – 0.6, гептагідрат сульфату магнію ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 0.1, дигідрофосфат калію (KH_2PO_4) – 0.14, рН на рівні 6.8–7.0. В середовище додавали дріжджовий автолізат у концентрації 0.5 % (за об'ємом) і розчин мікроелемент у кількості 0,1% (за об'ємом). Розчин мікроелементів складався з таких солей (г/100 мл): сульфату цинку 7-водний ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 1.1, сульфат заліза 7-водний ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 0.1, сульфат міді 5-водний ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) – 0.004, сульфат мангану 1-водний ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) – 0.6, сульфат кобальту 7-водний ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 0.03, борна кислота (H_3BO_3) – 0.006, йодид калію (KI) – 0.0001, EDTA – 0.5. Як джерело вуглецю був використаний технічний гліцерин (він є побічним продуктом виробництва біодизелю, отриманого від Комсомольського біопаливного заводу, який знаходиться в Полтавській області), а також етанол, концентрація якого була 2.0 % (об'ємна частка).

Триптофан, попередник біосинтезу ауксинів, додавали в середовище культивування у вигляді розчину 1 %-ї концентрації. Кількість триптофану була 100, 200 або 300 мг/л для штамів бактерій IMB B-7241 й IMB B-7405. Для штаму IMB Ас-5017 вона становила 200 або 300 мг/л. Попередник вносили в середовище або на початку процесу, або під кінець експоненційної фази росту (тобто на 48 год культивування).

Інокулятом були культури, які перебували в експоненційній фазі росту, одержані на рідких поживних середовищах, в яких знаходилось 0,5–1 % (об'ємна частка) субстрату. Посівний матеріал (10^4 – 10^5 кл/мл) вносили в кількості 5–10 % від об'єму поживного середовища. Бактерії культивували в 750 мл колбах, в яких

знаходилося 100 мл середовища. Колби розміщували на качалках (320 об/хв) за температури 28–30 °C протягом 5 діб (120 год).

2.3. Одержання екстрактів з фітогормональною активністю

2.3.1. Одержання фітогормональних екстрактів. Після закінчення процесу культивування штамів *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 та *R. erythropolis* IMB Ac-5017, біомасу відокремлювали за допомогою центрифугування (швидкість обертів 5000 об/хв, тривалість 25 хвилин). Залишкову соняшникову олію з культурної рідини видаляли за допомогою триразової екстракції петролейним ефіром у співвідношенні 1:1.

З супернатанту культурної рідини отримували фітогормональні екстракти. Екстракти гіберелінів та ауксинів отримували шляхом потрібної екстракції етилацетатом (у співвідношенні 1:1) за рН 2,5, а цитокінінові – шляхом екстрагування бутанолом (у співвідношенні 1:1) за рН 8,0. Після отримання екстрактів проводили їх випарювання до повної сухості під вакуумом. Сухий матеріал розчиняли повторно у 80%-му етанолі. Одержані екстракти зберігалися в морозильній камері при температурі –24°C і використовувалися для проведення подальших вегетаційних досліджень.

2.3.2. Визначення якісного і кількісного складу фітогормонів.

Ауксини. Процес очищення та концентрації фітогормональних екстрактів (з використанням накопичувальної тонкошарової хроматографії) здійснювали на пластинах із силікагелю марки "Silufol UV254" (Chemapol, Чехія) у розчиннику, що складався з таких компонентів, доданих послідовно: хлороформ, 12,5% водного аміаку, етилацетат та оцтова кислота у співвідношенні 20:1.

Аналіз якісного і кількісного складу ауксинів проводили, використовуючи рідинний хроматограф Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) і мас-спектрометричний детектор Agilent G1956B, які застосовуються для проведення високоефективної рідинної хроматографії (HPLC). Аналіз HPLC/MS екстрактів ауксинів *N. vaccinii* IMB B-7405 був проведений у Центрі колективного

користування ІМВ ім. Д. К. Заболотного Національної академії наук України.

- IAA – Індол-3-оцтова кислота (Indole-3-acetic acid)
- ICal – Індол-3-карбоксальдегід (Indole-3-carboxaldehyde)
- IC – Індол-3-карбінол (Indole-3-carbinol)
- ICA – Індол-3-карбоксилова кислота (Indole-3-carboxylic acid)
- IAA-hydr. – Гідразид індол-3-оцтової кислоти (Indole-3-acetic acid hydrazide)
- IBut – Індол-3-масляна кислота (Indole-3-butyric acid)

Метанол (А) та 1% водний розчин оцтової кислоти (В) використовувалися як рухома фаза. Розділення відбувалося на хроматографічній колонці марки Zorbax SB-C18 (150 мм на 2,1 мм, 3 мікрметри) від Agilent Technologies, США. Швидкість потоку через колонку становила 0,25 мл/хв, температура термостату була встановлена на рівні 30 °С, об'єм інжекції складав 2 мкл. Елюювання проводили за градієнтною схемою: від 0 до 25 хв розчин А складав 30%, а розчин В - 70%, після чого вміст розчину А збільшувався до 100% до 35-ї хвилини.

Сполуки виявляли за допомогою діодно-матричного детектора, який реєстрував сигнали при 254 та 280 нм, а їх спектри поглинання зафіксували в діапазоні 191-700 нм. Мас-спектрометричний детектор Agilent G1956В використовували для визначення молекулярних мас. Позитивні іони фіксувалися в режимі SCAN в діапазоні мас-заряду від 100 до 1200 за допомогою іонізації в режимах ESI та APCI. Калібрування здійснювали за допомогою стандартних розчинів ауксинів.

Гібереліни. Очищення і концентрування фітогормональних екстрактів здійснювали аналогічно до екстрактів ауксинів.

Гібереліни аналізували методом HPLC, визначаючи їх якісний і кількісний склад. Розділення проводили на аналітичній колонці Zorbax SB-C18 (розміри колонки 2,1мм×150мм, 3 мкм) від компанії Agilent Technologies, США. Швидкість руху рухомої фази через колонку була 0,35 мл/хв, при цьому температура термостату колонки була встановлена на рівні 30°C, а об'єм інжекції

складав 3 мікролітри. Елюювання відбувалося у градієнтному режимі за допомогою системи ацетонітрилу (А) та 0,1% водного розчину мурашинної кислоти (В). Починали з витрисування 20% А протягом 5 хв, далі збільшували вміст А поступово від 20% до 80% протягом 10 хв, після чого швидко підвищували вміст А до 100% за 0,5 хв. Таке співвідношення розчинів залишалось протягом наступних 8,5 хв. Стандартизовані розчини гіберелових кислот ГК₃, ГК₄ та ГК₇ від Sigma-Aldrich, Німеччина використовували для ідентифікації.

Для детекції гіберелінів використовувалися діодно-матричний детектор, який реєстрував сигнали при довжинах хвиль 198 та 210 нанометрів.

Мас-спектрометричний аналіз здійснювали з реєстрацією як позитивних, так і негативних іонів у співвідношенні маси до заряду (m/z) в діапазоні від 190 до 400. Для флуоресцентного детектора використовували екстинцію при 210 нм та емісію при 410 нм.

Цитокініни. Фітогормональні екстракти, які були попередньо очищені, розділяли на пластинках розміром 20 на 20 см (з оксидом алюмінію) марки «Merck», номер 5554. Для тонкошарової хроматографії використовувалася суміш н-бутанолу, аміаку та води у пропорціях 86:5:9. Кількісне визначення фітогормонів здійснювалося з використанням скануючого спектроденситометра фірми «Сорбфіл».

2.4. Ензиматичні аналізи

Ензиматичні аналізи проводили для визначення активності ферменту трансамінази після внесення триптофану.

2.4.1. Одержання безклітинних екстрактів. На першому етапі отримання бактеріальних безклітинних екстрактів культуральну рідину, одержану після вирощування бактерій *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 й *R. erythropolis* IMB Ac-5017, центрифугували при 4000 g, протягом 15 хв, за температури 4°C. Отриманий осад клітин подвійно промивали від залишків

середовища за допомогою 0,05 М K^+ -фосфатного буферу при рН 7,0, після чого знову центрифугували (4000 g, 15 хв, 4°C). Промиті клітини ресуспендували в 0,05 М K^+ -фосфатному буфері при рН 7,0 і проводили руйнування ультразвуком (22 кГц) тричі по 60 секунд при температурі 4°C на апараті УЗДН-1. Отриманий дезінтеграт центрифугували при 12000 g, протягом 30 хв, при температурі 4 °С, осад прибирали, а надосадова рідина використовувалася як безклітинний екстракт.

2.4.2. Аналіз активності триптофантрансамінази.

Триптофантрансаміназну активність (ЕС 2.6.1.27, також відома як триптофан аміотрансфераза, L-фенілаланін-2-оксоглутарат аміотрансфераза, гідрокситриптофан аміотрансфераза, 5-гідрокситриптофан-кетоглутарова трансаміназа, L-триптофан трансаміназа) визначали шляхом формування L-триптофану і 2-оксоглутарату в індол-піруват, який аналізували спектрофотометрично при довжині хвилі 330 нм.

2.5. Одержання препаратів поверхнево-активних і визначення їх кількості

Концентрацію позаклітинних ПАР визначали, застосовуючи нашу модифіковану версію методу Блайя і Дайєра, після екстракції їх з супернатанту культуральної рідини за допомогою суміші метанолу і хлороформу у співвідношенні 1:2. Для отримання супернатанту культуральну рідину піддавали центрифугуванню при 5000 g упродовж 20 хвилин.

Зважаючи на те, що штами *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *N. vaccinii* IMB B-7405 й *A. calcoaceticus* IMB B-7241 виробляють як полярні, так і неполярні ліпіди, а традиційний метод Блайя і Дайєра, використовуваний для вилучення позаклітинних ПАР, здатний головним чином виділяти неполярні ліпіди, ми внесли зміни до класичної системи розчинників (або суміш Фолча), додавши соляну кислоту (1 М HCl). Ця модифікація дозволяє максимально повністю виділити і полярні, і неполярні ліпіди.

У циліндричну ділячку воронку об'ємом 100 мл наливали 25 мл супернатанту, додаючи 1 н розчин HCl до pH 4,0-4,5 (приблизно 5 мл). Після цього воронку закривали шліфованою пробкою і струшували протягом 3 хвилин. Потім після цього вносили 15 мл суміші метанолу і хлороформу у співвідношенні 1:2 і знову струшували (екстрагування ліпідів) протягом 5 хвилин. Після екстракції залишали отриману суміш в ділильній воронці з метою поділу фаз. Потім зливали нижню фракцію (це був органічний екстракт 1), тоді як водну фазу піддавали екстракції вдруге. Під час повторної екстракції до водної фази додавали розчин соляної кислоти (1 н HCl), щоб досягнути pH 4,0-4,5 (приблизно 5 мл). До цієї фази також додають 15 мл суміші метанолу і хлороформу у співвідношенні 1:2 і екстрагують ліпіди протягом 5 хвилин. Після поділу фаз нижню фракцію зливають, одержуючи органічний екстракт 2. На третьому етапі 25 мл суміші, яка складається з метанолу і хлороформу у співвідношенні 1:2, додають до водної фази і проводять екстракцію, так як описано вище, отримуючи таким чином органічний екстракт 3. Екстракти 1-3 об'єднують і випаровують на роторному випарнику IP-1M2 при температурі 50 °C і тиску 0,4 атм, поки не буде отримана постійна маса.

2.6. Дослідження антимікробної активності ПАР

Показник мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) аналізували для визначення антимікробної активності поверхнево-активних речовин. Для цього застосовували метод двократних серійних розведень із використанням м'ясо-пептонного бульйону (МПБ). У 10 скляних пробірок в стерильних умовах вносили по 1 мл середовища. У першому пробірці добавляли 1 мл 1 мл розчину ПАР відомої концентрації, перемішували, потім відбирали по 1 мл і додавали у наступну пробірку. Таке розведення проводили для інших дев'яти пробірок. З останньої пробірки було відібрано 1 мл. Як результат, кінцевий об'єм у всіх пробірках становив 1 мл (МПБ і розчин ПАР), у ту ж чергу концентрація ПАР у кожній наступній пробірці зменшувалася вдвічі. В якості контролю

використовували 1 мл МПБ, який не містив розчин ПАР. Потім до кожної пробірки додавали по 0,1 мл суспензії тестових культур (10^5 – 10^6 КУО/мл) з подальшим перемішуванням. Пробірки витримували у термостаті впродовж 24 годин, а температура становила 28-30 °С.

Для оцінки результатів ми спостерігали за ступенем помутніння середовища: (+) – у пробірках, де спостерігалось помутніння середовища (ріст тестової культури), (–) – де помутніння відсутнє (ріст не спостерігали). МПК розчину поверхнево-активних речовин рахували як концентрацію поверхнево-активних речовин в останній пробірці, в якій не спостерігали росту.

2.7. Визначення впливу екзометаболітів на ріст і врожайність томатів, перців та ячменю

Вегетаційні досліді в теплиці. Експерименти проводили в теплицях у період з квітня по вересень. Як тест-культури використовували томати сорту Чикаго, Груша та Салатний, а також перці сорту Ротунда. Врожай збирали у період з липня по вересень. Перед посадкою у ґрунт кореневу систему розсади томатів протягом години витримували у розведених в 2 і 3 рази супернатантах культуральної рідини (КР) та культуральній рідині (розведення 1:200 та 1:400), отриманої після культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405, а також *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на рафінованій та відпрацьованій олії, а також у розчинах фітогормональних екстрактів: *N. vaccinii* IMB B-7405 (розведення 1:5000 та 1:10000), *A. calcoaceticus* IMB B-7241 (1:3000 та 1:5000). Кореневу систему розсади перців протягом двох годин витримували у розчинах фітогормональних екстрактів: *R. erythropolis* IMB Ac-5017 (розведення 1:1000 та 1:2000), *N. vaccinii* IMB B-7405 (розведення 1:10000), *A. calcoaceticus* IMB B-7241 (розведення 1:3000).

У якості позитивний контроль була використана розсада, витримана впродовж 1 години у розчинах фітогормональних екстрактів (розведення 1:1000), отриманих в аналогічних умовах культивування. Як негативний контроль

використовували розсаду, витриману протягом години у водопровідній воді. У кожному варіанті було по шість рослин. У процесі експерименту аналізували кількість плодів та їх масу.

Вегетаційні дослід на вегетаційному майданчику. Експерименти проводили в літній період (3 місяці) з використанням насіння пивоварного ячменю сорт. Врожай збирали у вересні. Перед посівом насіння протягом двох годин витримували у розведених в 10 і 20 разів супернатантах культуральної рідини, одержаних після вирощування досліджуваних штамів бактерій (ІМВ Ас-5017, ІМВ В-7241 й ІМВ В-7405) на відпрацьованій олії. Як позитивний контроль використовували те насіння, яке було витримане впродовж двох годин у розчинах фітогормональних екстрактів (розведення становило 1:1000), отриманих в аналогічних умовах культивування. В якості негативного контролю використовували насіння, яке було витримане упродовж години у дистильованій воді. Для аналізу результатів експерименту визначали вагу очищеного насіння та приріст врожаю відносно контролю (обробка насіння водою).

2.8. Визначення захисної дії поверхнево-активних речовин штаму ІМВ В-7405 проти бактеріозів томатів

Захисну дію ПАР *N. vaccinii* В-7405 здійснювали методом відокремленого листя. Як тест-культури фітопатогенів використовували *X. vesicatoria* ІМВ-9098 та *C. michiganensis* ІМВ-10₂, при ураженні якими на листі рослини з'являються некрози.

Через 2 місяці після постановки вегетаційного дослід рослин у фазі цвітіння обробляли розчином ПАР концентрацією 20 мкг/мл. Через добу здійснювали відбір листя з оброблених ПАР рослин та з необроблених. Листя розкладали в чашки Петрі на стерильні ватні тампони, змочені 5 мл стерильною водопровідною водою. Після цього листя обприскували суспензією фітопатогенних бактерій (10^7 - 10^8 КУО/мл), вирощених на МПА протягом 48 год. Як контроль використовували листя, оброблене стерильною водопровідною водою. Закриті

чашки Петрі інкубували за кімнатної температури при природному освітленні протягом 7 днів і спостерігали за перебігом захворювання. Ступінь розвитку бактеріозів розраховували як відсоткове відношення площі ураженого захворюванням листка, до площі усього листка.

2.9. Статистична обробка експериментальних результатів

Всі експерименти були проведені у трьох повторах, з кількістю паралельних вимірювань від трьох до п'яти. Істинність результатів досліджень була оцінена відповідно до t -критерію Стьюдента. Проведення вимірювань відбувалося за такою процедурою (Руденко, 2012):

- 1) Розраховували середньоарифметичне значення одержаних результатів:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i, \quad (2.2)$$

де x_i – значення варіанту, $\sum_{i=1}^n x_i$ – сума варіантів від першого (x_1) і до n -го варіанту, n – узагальнене число варіантів або об'єм цієї сукупності.

- 2) Було розраховано відмінність між середніми значеннями вибірок.:

$$d = |\bar{x}_1 - \bar{x}_2|, \quad (2.3)$$

- 3) Для встановлення, вірогідна або випадкова дана різниця, розраховували помилку різниці середніх значень за формулою:

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum(x_1 - \bar{x}_1)^2 + \sum(x_2 - \bar{x}_2)^2}{(n-1) \times n}}, \quad (2.4)$$

- 4) Розраховували фактично визначену величину критерію Стьюдента (t -критерію):

$$t_\phi = \frac{d}{S_d}, \quad (2.5)$$

- 5) Визначали число ступенів вільності:

$$k = n_1 + n_2 - 2, \quad (2.6)$$

- 6) Було вибрано значення стандартного t -критерію (t_{st}) для обраного рівня значущості α .

Якщо значення t_ϕ більше або дорівнює значенню t_{st} , то нульова гіпотеза спростовується при великому рівні значимості ($P < 0,05$).

Результати отриманих досліджень виявилися статистично значущими згідно з t -критерієм Стюдента на рівні значущості 5%.

Відповідні розрахунки проводили з використанням математичного програмного забезпечення Mathcad.

РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241, *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 ТА *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* IMB AC-5017 НА ВРОЖАЙНІСТЬ ПЕРЦІВ, ТОМАТІВ ТА ЯЧМЕНЮ

Протягом останнього десятиліття більшість аграрно-орієнтованих досліджень були спрямовані на вивчення ризосферних мікроорганізмів. Асоціація рослин з мікроорганізмами, які не пригнічують або навіть стимулюють їх розвиток, привертає увагу науковців не тільки як об'єкт дослідження з урахуванням основ взаємодії різних організмів, але й через їх можливе використання в практиці екологічного виробництва сільськогосподарської продукції.

3.1. Синтез фітогормонів продуцентами поверхнево-активних речовин

У табл. 3.1 наведено дані щодо утворення фітогормонів під час культивування бактерій *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405, а також *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на рафінованій і відпрацьованій олії.

Таблиця 3.1 – Синтез фітогормонів *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 і *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017

Досліджуваний штам	Ауксини, мкг/л	Гібереліни, мкг/л	Цитокініни, мкг/л	Сумарна концентрація, мкг/л
Субстрат – рафінована олія				
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	770,40	5,96	348,00	1124,36
<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	39,60	8,00	75,10	122,70
<i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017	19,40	7,80	17,10	44,30
Субстрат – відпрацьована олія				
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	23,30	46,80	53,90	124,00

Досліджуваний штам	Ауксини, мкг/л	Гібереліни, мкг/л	Цитокініни, мкг/л	Сумарна концентрація, мкг/л
<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	83,20	9,50	43,60	136,30
<i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017	91,30	5,80	37,80	134,90

Ці дані необхідні для визначення ступеня розведення супернатанту культуральної рідини до оптимальної за фітогормонами концентрації з метою максимальної стимуляції врожайності рослин.

3.2. Врожайність пивоварного ячменю при обробці позаклітинними метаболітами штамів IMB B-7241, IMB B-7405 та IMB Ac-5017

Експерименти показали, що обробка насіння ячменю екзометаболітами *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405, а також *R. erythropolis* IMB Ac-5017 супроводжувалася стимуляцією росту ячменю та збільшенням його врожайності (табл. 3.2).

Найвищий (83 %) приріст врожаю досягався за обробки насіння ячменю розведеним у 20 разів супернатантом штаму *R. erythropolis* IMB Ac-5017. Незалежно від розведення супернатанту *A. calcoaceticus* IMB B-7241 спостерігали однакове збільшення врожаю ячменю (68–69 %). Менш ефективним виявився супернатант *N. vaccinii* IMB B-7405: максимальне підвищення врожайності ячменю становило 58%.

Оскільки концентрація фітогормонів, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 та *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на середовищі, яке містило відпрацьовану олію, є практично однаковою (див. табл. 3.1), однаковий приріст врожаю ячменю незалежно від розведення супернатанту штаму IMB B-7241 (на відміну від супернатанту штамів Ac-5017 і IMB B-7405, див. табл. 3.2) можна пояснити тим, що цей штам утворює й інші метаболіти, що позитивно впливають на ріст ячменю.

Таблиця 3.2 – Показники урожайності ячменю за обробки екзометаболітами *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, а також *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017

Штам-продуцент	Варіант обробки	Вага насіння, г	Збільшення врожаю, % до контролю
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	Супернатант КР (1:10)	331	42
	Супернатант КР (1:20)	371	59
	Екстракт фітогормонів (1:1000)	370	58
<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	Супернатант КР (1:10)	394	68
	Супернатант КР (1:20)	396	69
	Екстракт фітогормонів (1:1000)	345	47
<i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017	Супернатант КР (1:10)	312	33
	Супернатант КР (1:20)	429	83
	Екстракт фітогормонів (1:1000)	381	63

Примітка. Вага насіння у контрольному варіанті (обробка насіння ячменю водою) становила 234 г. КР – культуральна рідина.

3.3. Вплив екзометаболітів *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, а також *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 на кількість врожаю томатів

Результати наших досліджень показали, що при обробці розсади томатів сорту Чикаго позаклітинними метаболітами *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405, а також *R. erythropolis* IMB Ac-5017 перед посадкою в ґрунт

сприяла зростанню розсади, збільшенню кількості утворених квітів та прискоренню формування та дозрівання плодів (табл. 3.3).

Таблиця 3.3 – Вплив позаклітинних метаболітів *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, а також *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 на кількість врожаю томатів сорту Чикаго

Штам-продуцент	Варіант обробки	Сумарна вага плодів, г	Кількість плодів, шт.
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	Супернатант КР (1:1)	673	10
	Супернатант КР (1:2)	834	14
	Екстракт фітогормонів (1:1000)	647	12
<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	Супернатант КР (1:1)	971	21
	Супернатант КР (1:2)	858	18
	Екстракт фітогормонів (1:1000)	611	15
<i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017	Супернатант КР (1:1)	987	18
	Супернатант КР (1:2)	1226	25
	Екстракт фітогормонів (1:1000)	2069	33

Примітка. Сумарна вага плодів у контрольному варіанті (тобто обробка кореневої системи томатів водою) становила 1167 г, а кількість плодів – 15 шт. КР – культуральна рідина.

Обробка розсади томатів розведеним у 2 і 3 рази супернатантом, а також екстрактом фітогормонів штаму *R. erythropolis* IMB Ac-5017 супроводжувалася збільшенням кількості плодів на 12, 56 і 106% відповідно порівняно з обробкою водою. Зазначимо, що кількість врожаю томатів під кінець вегетації у варіанті з обробкою фітогормональним екстрактом перевищила контроль на 77%.

Що стосується екзометаболітів штаму *A. calcoaceticus* IMB B-7241, то за обробки супернатантом, розведеним в 2 і 3 рази, вага плодів знижувалася, проте їх кількість перевищувала таку у контрольному варіанті на 20 і 40% відповідно. Обробка екзометаболітами штаму *N. vaccinii* IMB B-7405 не спричиняла стимулювальної дії на врожайність рослин томатів (див. табл. 3.3). Різні результати впливу екзометаболітів трьох досліджуваних штамів на урожайність томатів (див. табл. 3.3) може бути зумовлена різною концентрацією фітогормонів,

які були синтезовані досліджуваними бактеріями – *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405, а також *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на середовищі з рафінованою олією (див. табл. 3.1). Штам бактерій *N. vaccinii* IMB B-7405 утворює практично в 10 разів більшу кількість фітогормональних сполук, ніж *A. calcoaceticus* IMB B-7241. У ту ж чергу він синтезує в 25 разів більше фітогормонів, ніж штам *R. erythropolis* IMB Ac-5017. Ми знаємо, що фітогормони у надто високих концентраціях спричиняють пригнічувальну дію на рослини, а не стимулювальну (Pirog, Kliuchka, Klymenko, Shevchuk, & Iutynska, 20196). Оскільки розведення супернатантів культуральної рідини усіх трьох штамів під час обробки томатів були однаковими, то концентрація фітогормонів в них відрізнялася на порядки, а оптимальною для стимуляції росту і збільшення врожайності рослин виявилася концентрація екзометаболітів *R. erythropolis* IMB Ac-5017.

Тому на наступному етапі з метою визначення ефективної концентрації фітогормонів обробку кореневої системи томатів проводили розбавленими розчинами фітогормональних екстрактів штамів IMB B-7405 та IMB B-7241 (табл. 3.4). Експерименти показали, що обробка розсади томатів сорту Груша екзометаболітами і *N. vaccinii* IMB B-7405, і *A. calcoaceticus* IMB B-7241 перед висадкою у ґрунт супроводжувалася стимуляцією росту розсади, прискоренням дозрівання плодів та збільшення їх кількості і ваги (табл. 3.4).

Таблиця 3.4 – Показники урожайності томатів сорту Груша за обробки фітогормональними екстрактами *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 та *Nocardia vaccinii* IMB B-7405

Штам-продуцент	Розведення фітогормона- льного екстракту	Сумарна вага плодів, г	Кількість плодів, шт.
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	1:5000	481	19
	1:10000	705	25
<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	1:3000	1054	41
	1:5000	701	28

Примітка. Сумарна вага плодів у контрольному варіанті (обробка кореневої системи розсади томатів водою) становила 428 г, а кількість плодів – 17 шт.

Залежно від ступеня розведення фітогормональних екстрактів загальна вага плодів, зібраних з оброблених ними рослин, була на 11–145% вищою, ніж в контрольному варіанті (табл. 4). Найбільший приріст врожайності (64 і 145%) спостерігався у разі обробки рослин розчинами фітогормональних екстрактів *N. vaccinii* IMB B-7405 (розведення 1:10000) та *A. calcoaceticus* IMB B-7241 – (розведення 1:3000) відповідно.

Одержані результати можуть бути використані в подальшому для підбору оптимального розведення фітогормонвмісних супернатантів культуральної рідини продуцентів ПАР при використанні їх у рослинництві для стимуляції росту сільськогосподарських рослин.

3.4. Урожайність перців за дії екзометаболітів штамів IMB Ac-5017, IMB B-7405, IMB B-7241

Як другу тест-культуру було обрано перці сорту Ротунда, які, так само як і томати, належать до сімейства Пасльонових. У даних експериментах досліджували вплив на врожайність рослин оптимальної для кожного штаму концентрації фітогормонів, визначеної на основі попередніх досліджень з обробки томатів (див. табл. 3.3 і табл. 3.4).

Таблиця 3.5 – Вплив фітогормональних екстрактів *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *N. vaccinii* IMB B-7405, а також *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на врожайність перців

Штам-продуцент	Розведення фітогормонального екстракту	Сумарна вага плодів, г	Кількість плодів, шт.
<i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017	1:1000	288	10
	1:2000	263	8
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	1:10000	457	10
<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	1:3000	406	12

Примітка. Сумарна вага плодів у контрольному варіанті (обробка кореневої системи розсади перцю водою) становила 258 г, а кількість плодів – 8 шт.

Встановлено, що в усіх варіантах обробки кореневої системи розсади перцю фітогормональними екстрактами досліджуваних штамів прискорювалося цвітіння та дозрівання плодів, а також збільшувалася їх кількість або маса порівняно з обробкою водою (табл. 3.5).

Дані, наведені у табл. 3.5, показують, що обробка рослин екзометаболітами *N. vaccinii* IMB B-7405 (розведення 1:10000) та *A. calcoaceticus* IMB B-7241 (розведення 1:3000) найкраще стимулювала ріст і розвиток перців: кількість плодів і загальна вага перевищувала контроль на 25–50% і 77–57% відповідно. Ці результати співпадають з одержаними нами в експериментах з томатами, що свідчить про те, що така концентрація фітогормонів є оптимальною для стимуляції росту рослин.

Висновки до розділу 3

У результаті обробки рослин томатів, перцю та ячменю спостерігали прискорення цвітіння та дозрівання плодів, а також збільшення їх кількості або маси порівняно з обробкою водою. При обробці кореневої системи рослин томатів і перцю було визначено, що найкраща стимуляція росту відбувається за більшого розведення супернатанту або культуральної рідини (1:2) – це свідчить про те, що надто висока концентрація фітогормонів негативно впливає на ріст і розвиток рослин. Отже, було встановлено, що оптимальне розведення фітогормонів для проявлення максимальної стимулювальної дії для кожного зі штамів було різним залежно від вмісту фітогормонів у культуральній рідині: розведення 1:10000 для *N. vaccinii* IMB B-7405, 1:3000 для *A. calcoaceticus* IMB B-7241 і 1:1000 для *R. erythropolis* IMB Ac-5017. Позитивний вплив на врожайність сільськогосподарських рослин позаклітинних метаболітів, які були синтезовані *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *N. vaccinii* IMB B-7405, а також *A. calcoaceticus* IMB B-7241, є основою для створення інтегрованої технології одержання мікробних препаратів з ріст-стимулювальною та антимікробною щодо фітопатогенів активністю з метою застосування в рослинництві.

РОЗДІЛ 4. ІНТЕНСИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ ФІТОГОРМОНІВ АУКСИНОВОЇ ПРИРОДИ ЗА НАЯВНОСТІ ПОПЕРЕДНИКА

Більшість ґрунтових мікроорганізмів, які пов'язані або не пов'язані з рослинами, виробляють фітогормони ауксинового типу за наявності екзогенного триптофану в середовищі культивування, який є прекурсором для синтезу індол-3-оцтової кислоти. Зазвичай дослідники додають триптофан у культуральне середовище у лаг-фазі і переважно у великій кількості (до 10 г/л). Слід зауважити, що утворення фітогормонів починається у стаціонарній фазі росту, тобто вони є вторинними метаболітами, тому доречним є внесення триптофану саме на цьому етапі культивування. Також, концентрація триптофану й інших попередників, які вносять для інтенсифікації синтезу мікробних технології, зазвичай становить 0,1-0,2 % від кількості джерела вуглецю у культуральному середовищі (Підгорський, Іутинська, & Пирог, 2010).

Нами було встановлено, що *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, а також *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 можуть синтезувати фітогормони ауксинової природи при вирощуванні на середовищах з різними субстратами без попередника (див. розділ 3.1), а значить, є потенційні шляхи для інтенсифікації їх синтезу.

4.1. Синтез ауксинів *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 та *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності триптофану в культуральному середовищі

Nocardia vaccinii IMB B-7405. Дані, наведені у табл. 4.1, показують, що відбувалося суттєве підвищення синтезу ауксинів незалежно від моменту внесення попередника у середовище, де культивували штам IMB B-7405, і з рафінованою, і з відпрацьованою олією порівняно з показниками на середовищі без триптофану.

Таблиця 4.1 – Продукування ауксинів при вирощуванні *N. vaccinii* IMB B-7405 на середовищі з триптофаном

Ауксини мкг/л	Триптофан, г/л						
	0	0,1		0,2		0,3	
	Момент внесення триптофану						
	-	0 год	48 год	0 год	48 год	0 год	48 год
Субстрат - рафінована олія							
ІОК	64,9	28,9	40,6	348,6	854,03	331,4	1986,7
ІКК	6,3	11,6	14,4	71,7	501,5	89,9	1157,0
ІК	2,13	17,7	84,9	11,3	—	—	—
Сумарна кількість	76,9	58,3	139,9	431,6	1355,5	421,4	3143,7
Субстрат – пересмажена олія							
ІОК	4,5	1258,9	874,3	2331,2	2166,4	4666,7	1538,8
ІКК	1,8	472,6	292,1	470,6	725,8	1139,2	719,7
ІК	—	—	—	—	12,7	—	—
Сумарна кількість	13,23	1731,5	1185,7	2801,8	2910,8	5805,9	2258,6

Примітка. ІОК – це індол-3-оцтова кислота, ІКК – це індол-3-карбонова кислота, ІК – це індол-3-карбоксальдегід, «—» – ауксинів не виявлено; 0 год – лаг-фаза, 48 год – кінець експоненційної фази.

Серед ауксинів були виявлені індол-3-карбоксальдегід; індол-3-карбонова кислота; індол-3-оцтова кислота; індол-3-оцтової кислоти гідразид; у ту ж чергу найбільшу кількість становила ІОК, попередником якої і є амінокислота триптофан. Зазначимо, що при додаванні у середовище з обома субстратами 0,3 г/л триптофану досягалася найвища концентрація ауксинів.

Відомо (Підгорський, Іутинська, & Пирог, 2010), що більшість прекурсорів використовуються у процесах біосинтезу вторинних метаболітів в кінці експоненційної фази росту або на початку стаціонарної фази. Це чітко спостерігалось в умовах культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 на середовищі, яке містило рафіновану олію: додавання 0,1, 0,2, 0,3 г/л триптофану під кінець експоненційної фази росту супроводжувалося збільшенням концентрації синтезованих ауксинів відповідно у 1,8, 17,8 та 41,3 рази (див. табл. 1).

У той самий час, інші закономірності були виявлені під час культивування штаму бактерій *N. vaccinii* IMB B-7405 у середовищі, яке містило відпрацьовану олію: для більшості випадків найвищу кількість ауксинів спостерігали при додаванні амінокислоти триптофану у лаг-фазі (див. табл. 4.1). Ми можемо припустити, що це пов'язано з якістю використовуваної в якості субстрату відпрацьованої олії, наприклад, з наявністю у її складі компонентів, які можуть проявляти дію на синтез фітогормонів.

Однак слід відзначити, що з огляду на організацію технологічного виробництва введення прекурсора на початку процесу є набагато зручнішим.

Дані з таблиці 4.1 свідчать про те, що концентрація утворених ауксинів зростала разом із збільшенням концентрації прекурсора у культуральному середовищі *N. vaccinii* IMB B-7405. Є припущення, що подальше збільшення кількості триптофану призведе до ще активнішого синтезу ауксинів. Проте на цьому етапі для створення ефективного препарату, що буде стимулювати ріст рослин, немає необхідності в інтенсифікації утворення фітогормонів, оскільки навіть за наявної кількості ауксинів (3000–5000 мкг/л, див. табл. 4.1) для обробки насіння або коріння рослин культуральну рідину *N. vaccinii* IMB B-7405 необхідно розводити у 400–500 разів і більше.

***Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241.** Дані у таблиці 4.2 підтверджують, що при додаванні триптофану до середовища культивування *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 кількість ауксинів збільшувалася.

Помітне збільшення концентрації ауксинів під час культивування штаму бактерій *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на етанолі (див. табл. 4.1) спостерігалось лише при введенні 300 мг/л, тобто максимальної кількості триптофану. При додаванні 100 мг/л триптофану рівень синтезу ауксинів практично не змінювався порівняно з тим, який був одержаний при культивуванні без додавання прекурсора. А при внесенні 200 мг/л, зокрема, під кінець експоненційної фази росту, спостерігалось деяке зростання – у 1,6 разів.

Таблиця 4.2 – Утворення ауксинів під впливом триптофану у процесі вирощування *A. calcoaceticus* IMB B-7241

Ауксини мкг/л	Триптофан, г/л						
	0	0,1		0,2		0,3	
	Момент внесення триптофану						
	-	0 год	48 год	0 год	48 год	0 год	48 год
Субстрат – техніний гліцерин							
ІОК	150,8	207,7	359,9	242,5	694,7	1123,0	4091,0
ІКК	24,6	171,1	309,2	184,4	600,3	401,7	717,9
ІМК	—	—	—	—	—	47,7	42,09
ІОК-гідразид	—	—	735,7	—	—	—	—
Сумарна кількість	175,4	378,8	1404,7	426,8	1295,04	1572,4	4850,9
Субстрат – етанол							
ІОК	173,3	126,9	130,08	135,7	136,04	995,47	710,13
ІКК	47,1	113,9	95,7	97,3	216,8	1242,0	396,74
Сумарна кількість	220,4	240,8	225,8	232,9	3529,0	2261,66	1106,87

Примітка. ІОК – це індол-3-оцтова кислота, ІКК – це індол-3-карбонова кислота, ІК – це індол-3-карбоксальдегід, ІМК – це індол-3-масляна кислота, ІОК-гідрозид – це індол-3-оцтової кислоти гідрозид, «–» – ауксинів не виявлено; 0 год – лаг-фаза, 48 год – кінець експоненційної фази.

При вирощуванні *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на середовищі, яке містило технічний гліцерин, додавання триптофану в кінці експоненційної фази росту у кількості 100, 200 і 300 мг/л призвело до збільшення концентрації синтезованих ауксинів в 8, 7,4 та 27,7 разів відповідно (див. табл. 4.2). Разом з цим, при вирощуванні *A. calcoaceticus* IMB B-7241 у середовищі, яке містило етанол, відмітили інші закономірності: у випадку внесення триптофану у лаг-фазі спостерігали найвищу кількість ауксинів для більшості варіантів. Втім, слід зазначити, що внесення попередника на початку технологічного процесу є зручнішим з точки зору організації його виробництва.

Дані табл. 2 показують, що при збільшенні кількості триптофану в середовищі культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 підвищувалася і концентрація утворених ауксинів. Можна припустити, що наступне збільшення

концентрації попередника супроводжувалося б подальшою інтенсифікацією синтезу ауксинів.

Тим не менш зараз для того, щоб створити діючих мікробний препарат для стимуляції росту рослин не має необхідності в одержанні вищої концентрації ауксинів, оскільки навіть за наявної кількості (2000–5000 мкг/л, див. табл. 4.2) культуральну рідину *A. calcoaceticus* IMB B-7241 треба розводити як мінімум у 400–500 разів для обробки насіння або кореневої системи розсади рослин.

***Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017.** Дані з табл. 4.3, засвідчують, що внесення триптофану у середовище, в якому культивували штам бактерій IMB Ac-5017 як у лаг-фазі, так і в експоненційній фазі сприяло підвищенню синтезу ауксинів. В даному досліді не визначали інтенсифікацію синтезу за внесення 100 мг/л триптофану, оскільки попередні результати (див. табл. 4.1 і 4.2) показали доцільність внесення більших кількостей триптофану.

Таблиця 4.3 – Продукування ауксинів штамом *R. erythropolis* IMB Ac-5017 у середовищі, яке містить

Ауксини мкг/л	Триптофан, г/л				
	0	0,2		0,3	
	Момент внесення триптофану				
	-	0 год	48 год	0 год	48 год
ІОК	2,5	565,3	374,8	424,9	1876,0
ІКК	5,4	606,0	273,1	320,2	320,2
ІМК	1,96	—	—	—	—
АБК	—	18,3	—	21,0	—
Сумарна кількість	9,9	1189,6	647,9	766,1	2398,1
Субстрат – етанол					
ІОК	110,3	3302,0	2189,0	4404,0	4597,0
ІКК	25,6	452,0	370,8	979,5	977,5
ІМК	—	41,6	38,0	54,8	59,7
АБК	7,2	104,4	111,6	113,7	—
Сумарна кількість	143,2	2899,9	2709,3	5551,9	5634,2

Примітка. ІОК – це індол-3-оцтова кислота, ІКК – це індол-3-карбонова кислота, ІК – це індол-3-карбоксальдегід, ІМК – це індол-3-масляна кислота, АБК – це абсцизова кислота.

«–» – ауксинів не виявлено; 0 год – лаг-фаза, 48 год – кінець експоненційної фази.

При внесенні 0,3 г/л амінокислоти триптофану під кінець експоненційної фази росту відбувався найактивніший синтез ауксинів – концентрація становила 2398,14 мкг/л порівняно з 9,85 мкг/л, одержаними на середовищі без прекурсора. Ці дані підтверджують наше припущення, що такі умови стимулюють інтенсифікацію синтезу фітогормонів, оскільки вони є вторинними метаболітами.

Разом з тим, коли 300 мг триптофану було додано до середовища з етанолом, кількість синтезованих штамом IMB Ac-5017 ауксинів була на рівні 5634,22 мкг/мл (див. табл. 4.3), що є вдвічі вище, ніж у випадку культивування на відпрацьованій олії за аналогічних умов. Аналогічно до культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на середовищі з відпрацьованою олією, культивування штаму на етанолі також супроводжувалося збільшенням концентрації ауксинів завдяки підвищенню концентрації триптофану. Проте варто відзначити, що рівень синтезу ауксинів, одержаних на етанолі, не змінювався в залежності від моменту введення триптофану. Загалом, додавання триптофану до середовища з кожним із субстратів призвело до значного збільшення загальної концентрації ауксинів (20-240 разів) порівняно з варіантом культивування, де попередник біосинтезу був відсутній.

4.2. Вплив умов культивування *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 й *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на активність ключового ферменту біосинтезу ауксинів

Для підтвердження того, що екзогенний триптофан дійсно залучається до біосинтезу ауксинів, аналізували активність триптофан трансамінази (табл. 4.4) – одного з ключових ферментів синтезу ІОК, який стимулює реакцію утворення індол-3-піровиноградної кислоти з 2-оксоглутарату і триптофану.

Як свідчать дані, наведені у табл 4.4, за наявності триптофану у середовищі культивування штамів IMB B-7405, IMB Ac-5017 й IMB B-7241 спостерігали підвищення у разів активності триптофан трансамінази порівнянно з

вирощуванням на середовищі без попередника.

Таблиця 4.4 – Активність триптофан трансамінази в клітинах *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, а також *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, які вирощували на середовищі з рафінованою олією та триптофаном

Продуцент	Субстрат	Момент внесення триптофану	Концентрація триптофану, мг/л	Активність ферменту (нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка)
<i>Nocardia vaccinii</i> IMB B-7405	Рафінована олія	Лаг-фаза	0	156
			300	833
		Кінець експоненційної фази	0	64
			300	348
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241	Технічний гліцерин	Лаг-фаза	0	71
			300	163
		Кінець експоненційної фази	0	210
			300	526
<i>Rhodococcus erythropolis</i> IMB Ac-5017	Етанол	Лаг-фаза	0	90
			300	452
		Кінець експоненційної фази	0	138
			300	714

Так, для *N. vaccinii* IMB B-7405 активність цього ферменту підвищувалася у 5,3-5,4 разів, для *A. calcoaceticus* IMB B-7241 – у 2,3-2,5 разів, для *R. erythropolis* IMB Ac-5017 – у 5,0-5,2 рази. Слід зазначити, що як для штаму IMB Ac-5017, так і для штаму IMB B-7241 активність триптофан трансамінази була вищою при внесенні попередника в кінці експоненційної фази, ніж у лаг-фазі, а для IMB B-7405 – навпаки, що узгоджується з одержаними нами даними щодо синтезу ауксинів (див. табл. 4.1, 4.2, 4.3).

Одержані результати (табл. 4.4) дають змогу припустити, що біосинтез ІОК у продуцентів ПАР відбувається через утворення індол-3-пірувату (див. рис. 1.1).

4.3. Врожайність томатів за дії екзометаболітів *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, які були синтезовані за наявності триптофану

В наступному вегетаційному досліді використовували культуральну рідину та супернатант лише штаму *N. vaccinii* IMB B-7405, оскільки при його культивуванні було одержано найвищу концентрацію ауксинів (табл. 4.1). Дані щодо врожайності рослин томатів, перед висадкою оброблених культуральною рідиною та супернатантом *N. vaccinii* IMB B-7405, одержаними після культивування на середовищі з триптофаном, наведено в табл. 4.5. З наведених даних видно, що обробка рослин екзометаболітами цього штаму в усіх варіантах сприяла підвищенню показників врожайності.

Таблиця 4.5 – Вплив екзогенних метаболітів штаму *N. vaccinii* IMB B-7405 на кількість врожаю томатів

Варіант обробки кореневої системи рослин	Загальна вага, % від контролю	Середня вага плоду, % від контролю
Супернатант культуральної рідини (1:200)	147	106
Супернатант культуральної рідини (1:400)	191	118
Культуральна рідина (1:200)	128	103
Культуральна рідина (1:400)	182	112

Примітка. Контроль (100%) – обробка кореневої системи розсади лише водою; в контрольних варіантах розчинами ПАР обробка не проводилася. Для одержання культуральної рідини (супернатанту) *N. vaccinii* IMB B-7405 вирощували на відпрацьованій олії, одержаній після смаження картоплі за наявності 300 мг/л триптофану. Розведення вибирали із розрахунку ефективної дії фітогормонів.

Найбільший приріст як загальної ваги томатів, так і середньої ваги плоду (82-91 і 12-18% відповідно) спостерігали при використанні супернатанту і культуральної рідини в розведенні 1:400. Показники врожайності дещо зменшувалися при зниженні ступеня розведення супернатанту і культуральної рідини. Такі результати спричинені тим, що за розведення 1:400 було досягнуто найбільш оптимальної концентрації ауксинів та інших фітогормонів у розчині для обробки.

Зазначимо, що для створення препарату для рослинництва доцільно

використовувати саме культуральну рідину, хоч показники врожайності томатів при обробки культуральною рідиною і супернатантом були майже однаковими, оскільки в такому випадку з технологічного процесу можна виключити стадію відділення біомаси.

Висновки до розділу 4

Було встановлено, що незалежно від моменту введення амінокислоти триптофану в культуральне середовище *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *N. vaccinii* IMB B-7405, а також *A. calcoaceticus* IMB B-7241 синтез ауксинів збільшувався порівняно з культивуванням на середовищі без триптофану. Найвища концентрація ауксинів досягалася за внесення у середовище 300 мг/л триптофану в усіх варіантах дослідів, однак оптимальний момент внесення (лаг-фаза чи кінець експоненційної) відрізнявся для кожного штаму, в тому числі залежно від джерела вуглецю.

Аналіз триптофан трансаміназної активності штамів IMB Ac-5017, IMB B-7241, IMB B-7405 показав, що вона підвищувалася при внесенні 300 г/л триптофану як у лаг-фазі, так і в кінці експоненційної фази, що підтверджує одержані дані щодо синтезу ауксинів.

У вегетаційному досліді з томатами було встановлено, що для проявлення максимальної стимулювальної дії фітогормонів на врожайність рослин культуральну рідину бактерій *N. vaccinii* IMB B-7405 потрібно розводити у 400 разів.

Одержані результати засвідчують можливість підвищення ефективності використання комплексного препарату у рослинництві.

РОЗДІЛ 5. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН, СИНТЕЗОВАНИХ ЗА НАЯВНОСТІ ПОПЕРЕДНИКА БІОСИНТЕЗУ АУКСИНІВ

Однією з характеристик мікробних поверхнево-активних речовин є залежність їхніх властивостей від умов вирощування продуцентів, оскільки поверхнево-активні речовини належать до вторинних метаболітів і синтезуються зазвичай у вигляді комплексу схожих сполук, склад і співвідношення яких можуть змінюватися в різних умовах культивування. Отже, важливо дізнатися, чи ПАР, синтезовані в умовах культивування, що забезпечують інтенсифікацію синтезу ауксинів, будуть характеризуватися необхідною для практичного використання біологічною активністю.

5.1. Антимікробна активність поверхнево-активних речовин, одержаних на середовищі з триптофаном, відносно фітопатогенних бактерій

У табл. 5.1 наведено показники синтезу поверхнево-активних речовин під час вирощування *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *A. calcoaceticus* IMB B-7241 і *N. vaccinii* IMB B-7405 на поживних середовищах з різними вуглецевими субстратами і триптофаном.

Таблиця 5.1 – Синтез поверхнево-активних речовин бактеріями *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 й *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності триптофану

Продуцент	Ростовий субстрат	Триптофан у середовищі, г/л	Концентрація ПАР, г/л
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241	Етанол	0	1,55±0,08
		0,3	1,60±0,08
	Технічний гліцерин	0	1,65±0,08
		0,3	1,75±0,09

Продуцент	Ростовий субстрат	Триптофан у середовищі, мг/л	Концентрація ПАР, г/л
<i>Nocardia vaccinii</i> IMB B-7405	Рафінована олія	0	1,50±0,07
		0,3	1,65±0,08
	Відпрацьована олія	0	1,55±0,08
		0,3	1,60±0,08
<i>Rhodococcus erythropolis</i> IMB Ac-5017	Етанол	0	1,50±0,07
		0,3	1,54±0,07
	Відпрацьована олія	0	1,80±0,09
		0,3	1,90±0,09

Аналогічні закономірності спостерігалися під час вирощування бактерій *R. erythropolis* IMB Ac-5017 у середовищі, яке містило етанол: концентрація ПАР перебувала в межах 1,50–1,54 г/л. Крім того, за використання відпрацьованої олії як субстрату спостерігали незначне підвищення (до 1,80–1,90 г/л) кількості синтезованих штамом IMB Ac-5017 поверхнево-активних речовин порівняно з таким на середовищі з етанолом (див. табл. 5.1).

Ці дані свідчать про те, що наявність попередника біосинтезу ауксинів у середовищі культивування з різними ростовими субстратами не впливала на концентрацію ПАР, синтезованих усіма досліджуваними штамми. Так, незалежно від природи джерела вуглецю і наявності триптофану у середовищі, в якому вирощували *A. calcoaceticus* IMB B-7241 і *N. vaccinii* IMB B-7405, кількість поверхнево-активних речовин становила 1,55–1,75 і 1,50–1,65 г/л відповідно.

5.2. Вплив триптофану на антимікробну активність поверхнево-активних речовин, які синтезовані *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 й *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241

На наступному етапі досліджували дію поверхнево-активних речовин, які були синтезовані разом з фітогормонами, на фітопатогенні бактерії (табл. 5.2).

Таблиця 5.2 – Антибактеріальна активність поверхнево-активних речовин, які були синтезовані *Rhodococcus erythropolis*IMB Ac-5017, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 й *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 в присутності триптофану

Штам- продуцент	Ростовий субстрат	Трипто- фан, мг/л	Мінімальні інгібуючі концентрації (мкг/мл) щодо					
			<i>Agrobacterium tumefaciens</i> УКМ В-1000	<i>Pseudomonas syringae</i> УКМ В-1027	<i>Xanthomonas vesicatoria</i> УКМ В-1106	<i>Pectobacterium carotovorum</i> УКМ В-1075	<i>Clavibacter michiganensis</i> IMB В-10 ₂	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> IMB В- 9167
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB В-7241	Етанол	0	90	180	90	90	90	90
		300	90	180	90	45	90	45
	Технічний гліцерин	0	90	180	90	180	180	180
		300	90	180	90	90	90	90
<i>Nocardia vaccinii</i> IMB В-7405	Рафінована олія	0	5,6	5,6	22,5	5,6	90	90
		300	1,4	1,4	11,3	1,4	22,5	45
	Відпрацьована олія	0	90	22,5	2,8	22,5	2,8	90
		300	45	5,6	0,7	1,4	1,4	22,5
<i>Rhodococcus erythropolis</i> IMB Ac-5017	Етанол	0	11,3	90	90	5,6	2,8	2,8
		300	5,6	45	45	2,8	1,4	1,4
	Відпрацьована олія	0	11,3	90	2,8	2,8	2,8	90
		300	5,6	45	1,4	1,4	1,4	22,5

Примітка. Під час визначення мінімальних інгібуючих концентрацій похибка не перевищувала 5 %.

З табл. 5.2. видно, що поверхнево-активні речовини, утворені при внесення в культуральне середовище *N. vaccinii* IMB B-7405 триптофану, проявляли вищу антимікробну активність відносно досліджуваних фітопатогенів, ніж ті ПАР, які були одержані на середовищі без попередника (*N. vaccinii* IMB B-7405). Такі самі закономірності спостерігалися і для ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017: антимікробна активність поверхнево-активних речовин, утворених за наявності у середовищі триптофану була у 2–4 рази вищою порівняно з встановленою для ПАР, синтезованих без попередника біосинтезу ауксинів. Зазначимо, що й показники МІК щодо досліджуваних тест-культур, визначені для поверхнево-активних речовин як *N. vaccinii* IMB B-7405, так і *R. erythropolis* IMB Ac-5017, були практично однаковими. Дещо інша картина спостерігалася для ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB B-7241. По-перше, поверхнево-активні речовини цього штаму характеризувалися у кілька разів нижчою антимікробною активністю щодо фітопатогенних бактерій, ніж ПАР як *N. vaccinii* IMB B-7405, так і *R. erythropolis* IMB Ac-5017. По-друге, мінімальні інгібуючі концентрації щодо деяких тест-культур ПАР, синтезованих за наявності триптофану, або не змінювалися порівняно з встановленими для препаратів, які були отримані без прекурсора біосинтезу ауксинів, або знижувалися незначно (з 90 до 45 мкг/мл). Отже, внесення триптофану в середовище культивування штамів не проявляло негативної дії на синтез ПАР.

5.3. Активність ключових ферментів біосинтезу поверхнево-активних речовин

Останній етап досліджень був присвячений аналізу активності ключових ферментів біосинтезу гліколідів (ФЕП-карбоксикіназа і ФЕП-синтетаза) та амінолідів (НАДФ⁺-залежна глутаматдегідрогеназа), які мають поверхнево-активні властивості, в клітинах *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *N. vaccinii* IMB B-7405 й *A. calcoaceticus* IMB B-7241 вирощених у середовищах з триптофаном і без нього (табл. 5.3).

Таблиця 5.3 – Вплив триптофану у середовищі культивування *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 й *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на активність ферментів біосинтезу поверхнево-активних речовин

Штам-продуцент	Ростовий субстрат	Вміст триптофану, мг/л	Активність, нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білку		
			НАДФ ⁺ -глутамат-дегідрогенази	ФЕП-синтетази	ФЕП-карбокси-кінази
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241	Технічний гліцерин	0	529±26	11780±580	278±13
		300	543±27	10500±515	543±27
<i>Nocardia vaccinii</i> IMB B-7405	Відпрацьована олія	0	850±42	10940±540	1700±85
		300	1220±61	11350±567	1800±90
<i>Rhodococcus erythropolis</i> IMB Ac-5017	Відпрацьована олія	0	588±29	4000±200	236±11
		300	805±40	4023±200	240±12

Дані щодо активності ферментів біосинтезу ПАР у досліджуваних штамів, наведені у табл. 5.3, корелювали з показниками антимікробної активності синтезованих ними поверхнево-активних речовин (див. табл. 5.2). Так, активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази (вона є ключовим ферментом біосинтезу аміноліпідів, що відповідають за антимікробну дію комплексу поверхнево-активних речовин) підвищувалася майже в 1,4 рази.

Під час вирощування як *N. vaccinii* IMB B-7405, так і *R. erythropolis* IMB Ac-5017 у середовищі з триптофаном синтезувалися й поверхнево-активні речовини з вищою антимікробною активністю (див. табл. 5.2). Зазначимо, що наявність попередника у середовищі вирощування цих штамів не впливала на активність обох ключових ферментів біосинтезу поверхнево-активних гліколіпідів.

У той же час у разі внесення триптофану у середовище, в якому культивували *A. calcoaceticus* IMB B-7241, активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази не змінювалася, а активність ФЕП-карбоксикінази підвищувалася майже в 2 рази порівняно з тою, яка була отримана на середовищі без прекурсору біосинтезу ауксинів (див. табл. 5.3). Такі показники активності ключових ферментів біосинтезу поверхнево-активних аміно- та гліколіпідів в клітинах *A. calcoaceticus* IMB B-7241, вирощених за наявності триптофану й без нього, й пояснюють практично однакову антимікробну активність ПАР, синтезованих за таких умов культивування цього штаму (див. табл. 5.2).

5.4. Вплив поверхнево-активних речовин на збудників бактеріозів томатів у дослідженнях *in vivo*

Наступні експерименти показали, що попередня обробка листя томатів розчинами ПАР, що були синтезовані *N. vaccinii* IMB B-7405 в присутності триптофану, сприяла захисту листя від ураження фітопатогенами (рис. 5.1, рис. 5.2). Листя вібирали з рослин томатів, кореневу систему яких педе висадкою витримували у розведеній культуральній рідині *N. vaccinii* IMB B-7405, одержаною після культивування на середовищі з відпрацьованої олією та триптофаном.

Так, протягом 7 діб на обробленому ПАР листі, зараженому фітопатогенами, не було виявлено жодних проявів захворювання (рис. 5.1а, рис. 5.2а). Обробка виявилася ефективною як у захисті від штаму IMB-9098, так і від IMB-10₂.

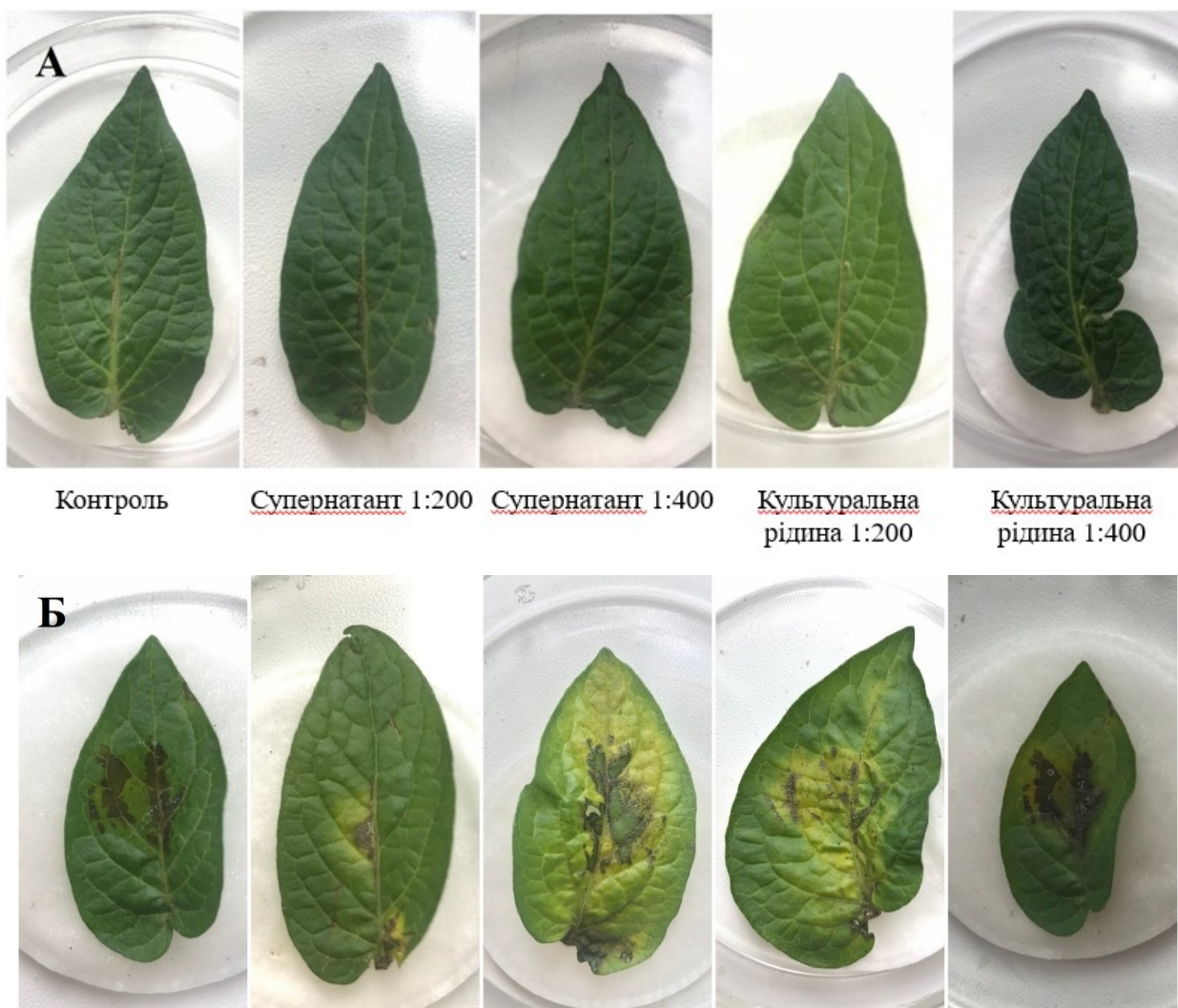


Рис. 5.1. Інокуляція штамом *X. vesicatoria* IMB-9098 листя томатів з попередньою обробкою ПАР (а) та без (б)

Рис. 5.1 і 5.2: листя відібрано з томатів, коренева система розсади яких перед посадкою у ґрунт була оброблена водою (контроль), розбавленими у 200 і 400 разів супернатантом і культуральною рідиною після вирощування бактерій *N. vaccinii* IMB B-7405 на пересмаженій олії за наявності триптофану (300 мг/л)

У той же час той же час ступінь ураження фітопатогенами необробленого розчинами поверхнево-активних речовин листя становив від 8 до 50% (рис. 5.1б, рис. 5.2б). Такі результати засвідчують високу ефективність антимікробної дії поверхнево-активних речовин проти бактеріозів томатів.

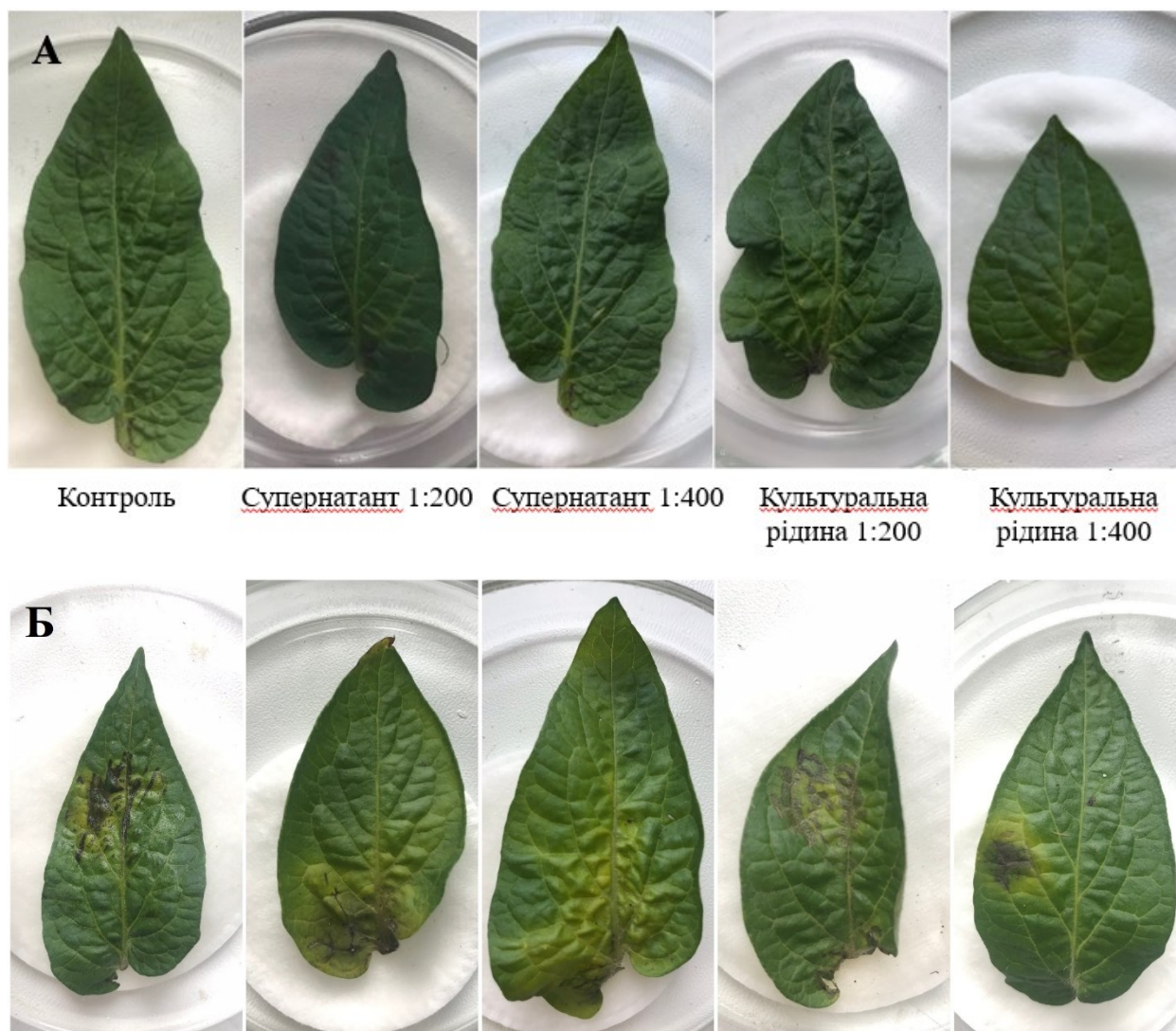


Рис. 5.2. Розвиток *C. michiganensis* IMB-10₂ за попередньої обробки
листя томатів ПАР (а) та за її відсутності (б)

Висновки до розділу 5

Встановлено, що наявність триптофану у середовищі культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *N. vaccinii* IMB B-7405, а також *A. calcoaceticus* IMB B-7241 не впливала на рівень синтезу поверхнево-активних речовин, а антимікробна щодо фітопатогенних бактерій активність синтезованих ПАР або залишалася без змін, або підвищувалася у декілька разів порівняно з встановленою для ПАР, синтезованих без попередника біосинтезу ауксинів. Здатність ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 до захисту від фітопатогенних бактерій проявлялася і в дослідженнях *in vivo*, оскільки на обробленому ПАР листі томатів, зараженому фітопатогенами, не було виявлено проявів захворювання.

Отримані дані підтверджують високу ефективність потенційного застосування комплексного препарату у сільському господарстві, який не лише стимулює ріст різних сільськогосподарських культур, але й контролює розвиток фітопатогенних бактерій.

РОЗДІЛ 6. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Перші повідомлення про здатність продуцентів ПАР синтезувати фітогормони з'явилися у 2008 р. (Buensanteai, Yuen, & Prathuangwong, 2008). Дослідниками було виявлено, що штам *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 здатний до утворення ІОК та сурфактину.

У 2015 р. ми опублікували роботу (Pirog та ін., 2015), в яких повідомили про здатність бактерій *N. vaccinii* IMB B-7405, які є продуцентами ПАР, синтезувати фітогормони ауксинової, цитокінінової та гіберелової природи. Це було перше повідомлення про синтез продуцентами ПАР, не лише одного класу, але цілого комплексу фітогормонів. Пізніше ця здатність була встановлена і для *R. erythropolis* IMB Ac-5017 й *A. calcoaceticus* IMB B-7241.

Так, вже була відома здатність ПАР штамів IMB Ac-5017, IMB B-7241, а також IMB B-7405 пригнічувати ріст фітопатогенних бактерій. Завдяки утворенню фітогормонів з ріст-стимулювальною активністю ми припустили, що культуральну рідину цих бактерій можна використовувати також для обробки різних культур рослин з метою підвищення врожайності. Це припущення було підтверджено експериментально (див. розділ 3). Так, при обробці рослин ячменю культуральною рідиною і рослин перців та томатів фітогормональними екстрактами спотерігали збільшення врожайності на 83–145%.

Літературні дані підтверджують збільшення врожайності як злакових культур, так і пасльонових (томати, перці) під дією ризобактерій та синтезованих ними фітогормонів. Так, передпосівна інокуляція насіння кукурудзи та пшениці штамми *Azospirillum brasilense* супроводжувалася підвищенням врожайності на 27 та 31 % відповідно (Hungria, Campo, Souza, & Pedrosa, 2010). У роботі (Khalid, Arshad, & Zahir, 2004) було ізольовано, проте не ідентифіковано, кілька штамів ризобактерій та показано, що вони

синтезують фітогормони ауксинової природи у високих кількостях (від 5,1 до 12,1 мг/л). Так, завдяки передпосівній обробці пшеничного насіння врожай збільшився на 15–27,5%. Інокуляція насіння ячменю ендofітним галотолератним штамом *Pseudomonas flavescens* D5 (Ignatova та ін., 2022), ізольованим з цикорію (*Cichorium intybus* L.), в умовах сольового стресу сприяла збільшенню маси пагона рослин ячменю до 30, а маси кореня – до 20%. Встановлено, що штам D5 продукував 45,2 мг/л ІОК на середовищі з 15% NaCl. Після інокуляції насіння ячменю ізольованим з його ризосфери штамом *P. fluorescens* B2-10, здатним до синтезу ІОК, висота рослин збільшувалася на 10, довжина колоса – на 30, вага 1000 зернят – на 14, а кількість зернят на колосі – на 14,6% (Azadikhah, Jamali, Nooryazdan, & Bayat, 2019).

Серед проаналізованих джерел, найбільший приріст врожаю зерна становив не більше 31% (Hungria, Campo, Souza, & Pedrosa, 2010), у той час як нами було одержано приріст 33–83%. Це свідчить про значний вплив екзометаболітів *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017, а також *N. vaccinii* IMB B-7405 на ріст і розвиток ячменю.

У роботі (Gravel, Antoun, & Tweddell, 2007) повідомляється про те, що передпосівна інокуляція насіння томатів різними штамми бактерій роду *Pseudomonas* супроводжувалася підвищенням ваги плодів на 9–14% порівняно з обробкою дистильованою водою. Бабу із співавт. було продемонстровано позитивний вплив обробки п'ятьма неідентифікованими штамми PGPR-бактерій, здатними до синтезу ІОК, на врожайність томатів: вага плодів перевищувала контроль на 51,3–116,0% (Babu, Jogaiah, Ito, Nagaraj, & Tran, 2015). Втім, нами було досягнуто приросту загальної ваги плодів на 145% при обробці томатів фітогормональними екстрактами *N. vaccinii* IMB B-7405.

Ahirwar із співавт. встановили, що обробка насіння томатів культуральною рідиною ізольованого з їх ризосфери штаму *P. fluorescens*, SS5, здатного до синтезу ІОК, дала змогу збільшити кількість плодів на 57, а

загальну вагу томатів на 28% порівняно з контролем (Ahirwar, Gupta, Singh, Rawlley, & Ramana, 2015). У роботі (Riyanti, Susilowati, Mulya, & Listanto, 2019) встановлено, що *Pseudomonas fragi*, який продукував до 14,77 мг/л ІОК, сприяв підвищенню врожайності томатів: кількість плодів на оброблених рослинах була майже в 5 разів більшою, ніж на необроблених, а висота рослин збільшилася на 7%. За обробки перцю культуральною рідиною *Methylobacterium populi* Gen-B2 вага пагона збільшувалася у 5 разів, а його висота – в 1,6 разів порівняно з обробкою неінокульованим середовищем (Yang, Shi, An, Sun, & Lu, 2022). Штам було виділено з ризосфери цукрової тростини та визначено, що він здатний до синтезу ІОК (6,46 мг/л).

В іншій роботі було виділено штам *Serratia nematodiphila* PEJ1011, який є ізолятом з ризосфери перцю, і він утворює гіберелін ГК₄ у кількості близько 8650 нг/л (Kang та ін., 2015). Інокуляція штамом PEJ1011 рослин перцю підвищувала довжину кореня та стебла на 55,8 та 12,9% відповідно. Штами *B. cereus* MJ-1, *B. pumilus* CJ-69 і *Bacillus macroides* CJ-29, які були ізольовані з ризосфери червоного перцю, сприяли збільшенню висоти рослин на 11–14, а їх ваги – на 21–30 % порівняно з контролем (Joo, Kim, Lee, Song, & Rhee, 2004).

У доступній літературі нам не вдалося знайти інформації про стимулювальний ефект здатних до синтезу фітогормонів бактерій на кількість та вагу перців, у зв'язку з чим неможливо провести порівняння одержаних нами даних щодо впливу екзометаболітів *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *N. vaccinii* IMB B-7405, а також *A. calcoaceticus* IMB B-7241 і на врожайність цих рослин. Разом з тим очевидним є зв'язок між обробкою як перців, так і томатів бактеріями, які утворюють позаклітинні фітогормони і стимуляцією росту і розвитку рослин, що узгоджується з нашими експериментальними даними.

Одержані результати щодо стимуляції врожайності рослин культуральною рідиною *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *N. vaccinii* IMB B-7405, а

також *A. calcoaceticus* IMB B-7241 стали основою для розробки комплексного мікробного препарату для використання у рослинництві.

У 2016 р. з'явилося повідомлення про утворення ІОК бактеріями, ізольованими з ґрунтів, які забруднені вуглеводнями і важкими металами (Pirog, Kliuchka, Klymenko, Shevchuk, & Iutynska, 2019б). Серед ізолятів були виявлені бактерії родів *Rhodococcus*, *Rahnella*, *Serratia* та *Proteus*. Проте концентрація утвореної ІОК не перевищувала 13 мкг/л. В наших дослідженнях ми показали можливість утворення продуцентом ПАР більше ніж 1000 мкг/л ІОК без внесення попередника біосинтезу.

У 2018-2019 роках були опубліковані роботи (Jayakumar, 2019; Sabaté, 2018), в яких було встановлено, що продуценти поверхнево-активних ліпопептидів і рамноліпідів мають здатність синтезувати фітогормони ауксинової природи у вищих концентраціях, ніж штами, досліджувані в нашій роботі. Так, ендofітний штам *Bacillus* sp. Fc11 (Jayakumar, Krishna, Mohan, Nair, & Radhakrishnan, 2019) утворював й ітурин А, й сурфактин, які виявили антимікробну активність проти фітопатогенних грибів родів *Fusarium*, *Sclerotium*, *Phytophthora*, *Corynespora*, а також індол-3-оцтову кислоту. Наявність ІОК у культуральній рідині було виявлено якісною реакцією з реагентом Салковскі без попереднього введення триптофану. Автори цієї роботи не проводили аналізу концентрації синтезованих ліпопептидів та ІОК. В іншій роботі проаналізовано штами *Bacillus* sp. P12б *Bacillus* sp. B19 і *Bacillus amyloliquefaciens* B14, ізольовані з ґрунтів. Ці штами утворюють комплекс антимікробних сполук, таких як поверхнево-активні ліпопептиди сурфактин, курстакін, фенгіцин, ітурин, а також антибіотик поліміксин, разом з ауксинами (Sabaté, Brandan, Petroselli, Erra-Balsells, & Audisio, 2018). Кількість ауксинів, продукованих штамами B19 і P12, була на рівні 5,71 і 4,90 мг/л. В середовище, в якому культивували бактерії, не додавали триптофан. Проте, в якості джерело

карбону при культивуванні продуцентів використовували триптон, який в своєму складі містить амінокислоту триптофан.

Використання мікробного біопрепарату на основі бактерій *N. vaccinii* IMB B-7405, *R. erythropolis* IMB Ac-5017, а також *A. calcoaceticus* IMB B-7241 і обмежувалося відносно низькою концентрацією фітогормонів у культуральній рідині (<1 мкг/л), у зв'язку з чим було прийнято рішення дослідити можливість інтенсифікації синтезу фітогормонів у досліджуваних штамів. Серед трьох класів фітогормонів (ауксини, цитокініни, гібереліни) для інтенсифікації було обрано саме ауксини, оскільки літературні дані засвідчують, що ауксин індол-3-оцтова кислота є одним найактивніших фітогормонів і саме її найчастіше використовують дослідники для стимуляції росту рослин.

На основі аналізу літературних даних було прийнято рішення вносити триптофан у кількостях 100, 200, 300 мг/л, оскільки внесення вищих кількостей хоч і призводить до одержання більшої концентрації ауксинів, проте недоцільно з економічної точки зору. Оскільки фітогормони є вторинними метаболітами, синтез яких відбувається у стаціонарній фазі росту, необхідно було дослідити, в який момент культивування доцільно вносити триптофан: на початку культивування (у лаг-фазі) чи в середині (кінець експоненційної фази). Більшість дослідників додають триптофан перед початком культивування. Втім, ми визначили, що залежно від субстрату для кожного штаму максимальна концентрація досягалася при внесенні попередника або у лаг-фазі, або в кінці експоненційної.

В описаних вище роботах роботах (Jayakumar, 2019; Sabaté, 2018) автори не намагалися підвищити синтез ІОК шляхом екзогенного додавання триптофану. Таким чином, наші дослідження є першими, в яких повідомляється про інтенсифікацію синтезу ауксинів продуцентами ПАР за наявності триптофану. Однак, в літературі є повідомлення щодо інтенсифікації

синтезу ауксинів іншими ґрунтовими мікроорганізмами.

Асоційовані з рослинами мікроорганізми за присутності 0,5-2 г/л триптофану утворюють до 170 мг/л ІОК, неасоційовані – до 83 мг/л ІОК. Серед них найбільшого ступеня інтенсифікації досягнули (Dasri, Kaewharn, Kanso, & Sangchanjiradet, 2014) – кількість ІОК збільшилася у 27 разів, однак становила усього 67 мкг/л. Значно вищою здатністю до утворення ауксинів володіють еукаріоти: за наявності 1-5 г/л триптофану в середовищі культивування вони синтезують 1-1,3 г/л ІОК (за відсутності триптофану в культуральній рідині ауксини не виявлені). Проте автори робіт (Bunsangiam, 2019; Fu, 2016; Nutaratat, 2016), у яких повідомлялося про одержання найвищих концентрацій ІОК (2,19 г/л, 5,56 г/л), вносили в середовище культивування мікроорганізмів дуже високі кількості триптофану (2-11 г/л). І при цьому ступінь інтенсифікації становив не більше 20 разів. За такої концентрації, триптофан можна вважати не лише попередником біосинтезу, але й ростовим субстратом. Крім того, внесення великих кількостей триптофану в якості компонента середовища для культивування недоцільно з точки зору економіки.

Отже, результати наших досліджень показали, що є можливість інтенсифікації синтезу ІОК у 27 разів для *A. calcoaceticus* IMB B-724, більш ніж у 240 разів для *R. erythropolis* IMB Ac-5017 та більш ніж у 400 разів для *N. vaccinii* IMB B-7405 та за умови внесення усього 0,3 г/л триптофану.

Також, багато науковців досліджують можливість синтезу фітогормонів на багатих поживних середовищах, в яких знаходяться різні джерела карбону, такі як манітол (Lebrazi та ін., 2020), триптон (Hasuty, Choliq, & Hidayat, 2018), лактоза (Nutaratat, Monprasit, & Srisuk, 2017), сахароза (Nutaratat, Srisuk, Arunrattiyakorn, & Limtong, 2016) та інші. Оскільки такі середовища для культивування мікроорганізмів, що виробляють фітогормони, є дороговартісними, існує потреба у знаходженні більш економічних альтернативних вуглецевих джерел.

В нашій роботі вибір субстратів для кожного зі штамів з метою інтенсифікації синтезу ауксинів обирали, враховуючи два фактори: субстрат, на якому було одержано найвищу кількість ауксинів порівняно з такою на інших субстратах (див табл. 3.1); субстрат, на якому антимікробна активність щодо фітопатогенних бактерій була вищою, оскільки це важлива характеристика для комплексного мікробного препарату. Таким чином, для штаму В-7405 було обрано рафіновану олію та відпрацьовану після смаження картоплі олію, для штаму ІМВ В-7241 – технічний гліцерин та етанол, для штаму ІМВ Ас-5017 – відпрацьована після смаження м'яса олія та етанол.

Слід зазначити, що використання відпрацьованої олії як субстрату дозволить утилізувати ці відходи та одночасно знизити собівартість препарату для рослинництва, оскільки в Україні викиди олії не регламентуються. Наші дослідження вперше показали можливість утворення ауксинів на недорогому середовищі з використанням пересмаженої олії в якості субстрату або технічного гліцерину. Подібні відомості у літературі відсутні.

В проведених нами вегетаційних дослідженнях ми спостерігали підвищення врожайності усіх культур (томати, перець, ячмінь, див. табл. 3.2-3.5). Нам вдалося підібрати оптимальний ступінь розведення культуральної рідини та супернатанту для проявлення стимулювальної дії фітогормонів на ріст і розвиток рослин. Втім, завдяки підвищенню концентрації фітогормонів у культуральній рідині за рахунок попереднього внесення триптофану під час культивування є змога збільшити кількість оброблюваних рослин. Так, робочий розчин мікробного препарату повинен містити усього 10^{-4} - 10^{-9} моль/л ауксинів для досягнення ефективної стимулювальної дії, а отже чим вищий вміст ауксинів в культуральній рідині, тим вищий ступінь розведення її водою, внаслідок чого одержуємо більший об'єм комплексного мікробного препарату для обробки рослин.

Для комплексного мікробного препарату важливо, щоб він мав як високу ріст-стимулювальну фітогормональну активність, так і фітопатогенну завдяки наявності поверхнево-активних речовин. Дослідниками (Passari та ін., 2016) з ризосфери томату (*Solanum lycopersicum*) було ізольовано штам-ендофіт *Streptomyces* sp. DBT20, який виявляв антифунгальну активність щодо фітопатогенних грибів родів *Fusarium*, *Aspergillus* і *Colletotrichum*. Після прикореневої обробки томатів та перцю чилі суспензією штаму DBT20 довжина кореня та пагона підвищувалися на 12–33% порівняно з необробленими рослинами. Автори встановили, що антагоністична активність бактерій *Streptomyces* sp. DBT20 щодо фітопатогенних грибів забезпечується синтезом антибіотиків, у той час як антимікробна активність досліджуваних нами штамів *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 та *R. erythropolis* IMB Ac-5017 (причому не тільки антифунгальна, а й антибактеріальна) зумовлена наявністю комплексу поверхнево-активних речовин, механізм дії яких, на відміну від антибіотиків, не викликає резистентності патогенних мікроорганізмів. У роботі (Parasuraman та ін., 2022) встановлено, що виділені з ризосфери баклажану та чилі штами *Pseudomonas aeruginosa* JB та JC підвищували схожість та індекс життєздатності насіння відповідних рослин порівняно з варіантом без обробки. Крім того, ці штами характеризувалися антимікробною щодо *Fusarium oxysporum* та *Alternaria solani* активністю.

Отже, роботи (Passari, 2016; Parasuraman, 2022) підтверджують актуальність інтегрованих мікробних технологій, спрямованих на досягнення двох цілей: підвищення врожайності та захист рослин від фітопатогенних грибів. Проте зазначимо, що досліджувані нами штами мають суттєву перевагу перед описаними у роботах (Passari, 2016; Parasuraman, 2022), оскільки характеризуються антимікробною активністю не тільки щодо фітопатогенних грибів, а й фітопатогенних бактерій.

Вибір тест-культур фітопатогенних мікроорганізмів для визначення антимікробної активності, притаманної поверхнево-активним речовинам *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *N. vaccinii* IMB B-7405, а також *A. calcoaceticus* IMB B-7241 був зумовлений такими причинами. По-перше, на теперішній час переважна більшість робіт щодо впливу ПАР мікробного походження на фітопатогени стосуються їх антифунгальної дії (Adeniji, 2019; Hazarika, 2019; Kim, 2000; Monnier, 2018; Rodrigues, 2017; Sha, 2016), і є значно менше повідомлень про антибактеріальну активність цих продуктів мікробного синтезу (Abdallah, 2018; Azaiez, 2018; Cao, 2018; Chen, 2020; Chopra, 2020; Kim, 2000; Sanchez, 2012). Разом з тим, проблемою сьогодення є боротьба з бактеріозами сільськогосподарських культур, на чому ми акцентували увагу в огляді (Pirog, Piatetska, Yarova, & Iutynska, 2021). По-друге, було встановлено, що за обробки кореневої системи розсади томатів екзометаболітами *N. vaccinii* IMB B-7405 спостерігали збільшення сумарної ваги плодів цих рослин на 30–90 % відносно контролю (обробка водою) (див табл. 3.3, 3.5). По-третє, в Україні томати уражуються бактеріальним раком *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, бактеріальною крапчатістю *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, чорною бактеріальною плямистістю *Xanthomonas vesicatoria*, а штами *Pseudomonas syringae* (плямистості різних видів рослин), *Pectobacterium carotovorum* (гнилі різних видів рослин), *Agrobacterium tumefaciens* (гали різних видів) є поліфагами, поширеними як в Україні, так і в світі (Gvozdyak та ін., 2011).

Наші результати показали, що внесення у середовище культивування штамів *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *N. vaccinii* IMB B-7405, а також *A. calcoaceticus* IMB B-7241 триптофану не супроводжувалося зниженням синтезу поверхнево-активних речовин (див. табл. 5.1) і їх антимікробної щодо фітопатогенних бактерій активності (див. табл. 5.2). Більше того, ПАР, синтезовані як *R. erythropolis* IMB Ac-5017, так і *N. vaccinii* IMB B-7405 на

середовищі, що містить триптофан, проявляли вищу у 2-4 рази антибактеріальну активність, ніж поверхнево-активні речовини, утворені на середовищі без попередника синтезу ауксинів. На нашу думку, це можна пояснити залученням екзогенного триптофану не тільки на утворення ауксинів, а й поверхнево-активних аміноліпідів, про що свідчило підвищення в клітинах як *R. erythropolis* IMB Ac-5017, так і *N. vaccinii* IMB B-7405 активності НАДФ⁺-залежних глутаматдегідрогеназ – ключових ферментів біосинтезу цих складових комплексу ПАР, відповідальних за антимікробну активність.

Наші дані відрізняються від встановлених у роботі (Ding, Zhang, Guo, & Chen, 2018) щодо впливу екзогенного індолу на утворення біомаси та аміноліпідів *Bacillus amyloliquefaciens* Pc3. Індол утворюється в клітинах бактерій як побічний продукт біосинтезу триптофану з фосфоенолпірувату і еритрозо-4-фосфату, і надалі індол може перетворюватися на триптофан за участю триптофансинтази. Профілі внутрішньоклітинних метаболітів, необхідних для синтезу аміноліпідів *B. amyloliquefaciens* Pc3, визначені на основі GC/MS-метаболоміки, показали зниження аспарагіну, аспарагінової кислоти, глутаміну, глутамінової кислоти, треоніну, валіну, ізолейцину, гексадеканової та октадеканової кислоти у клітинах, вирощених за наявності індолу. Внесення індолу у середовище культивування штаму Pc3 супроводжувалося зміною спрямованості метаболізму у бік утворення біомаси і зниженням синтезу аміноліпідів через брак попередників амінокислот і жирних кислот.

Порівняння антимікробної щодо фітопатогенних бактерій активності ПАР, які були синтезовані *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *N. vaccinii* IMB B-7405 й *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на середовищі з триптофаном, показало, що показники мінімальних інгібуючих концентрацій досліджуваних нами поверхнево-активних речовин є порівняними з встановленими для відомих у світі аміноліпідів (Abdallah, 2018; Cao, 2018; Chen, 2020; Le, 2020) і гліколіпідів

(Azaiez, 2018; Chopra, 2020; Kim, 2000; Sanchez, 2012) і навіть перевищують деякі з них.

Так, у роботі (Abdallah, Tounsi, Gharsallah, Hammami, & Frikha-Gargouri, 2018) встановлено, що мінімальні інгібуючі концентрації ліпопептидів *Bacillus subtilis* 32a відносно бактерій з фітопатогенними властивостями *Erwinia amylovora*, *A. tumefaciens* C58, *A. tumefaciens* B6, *Pseudomonas savastanoi* були на рівні 2-156 мкг/мл. Сао зі співавт. показали, що МІК ліпопептидів, утворених штамами бактерій *Bacillus velezensis* Y6 й *B. velezensis* F7, відносно бактерій *Ralstonia solanacearum* становили 100 і 500 мкг/мл відповідно (Сао та ін., 2018). Ще вчені встановили, що за рахунок синергізму різних ліпопептидів, продукованих цими штамами, комплекс ліпопептидів проявляв антимікробну активність на вищому рівні і вона становила 75 мкг/мл.

Ле зі співавт. встановили, що мінімальні інгібуючі концентрації пельгипептинів (PGPs), синтезованих *Paenibacillus elgii* JCK-5075 коливалися від 3,13 мкг/мл до 100 мкг/мл щодо більш ніж 10 видів збудників різних захворювань рослин (Ле та ін., 2020). До дії PGPs найбільш чутливими (МІК становили 3,13-6,25 мкг/мл) виявилися *A. tumefaciens*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *X. vesicatoria*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* та *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, а найстійкішими – *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* та *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (МІК 25 і 100 мкг/мл відповідно).

У 2020 р. вченими з Китаю (Chen та ін., 2020), було показано, що МІК щодо *R. solanacearum* аміноліпідів, синтезованих *B. velezensis* FJAT-46737 становила 500 мкг/мл. МІК гліколіпідів *B. amyloliquefaciens* Ar10 щодо збудників бактеріозів рослин *P. carotovorum* П16, *E. amylovora*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 знаходились в межах 1-50 мкг/мл (Azaiez та ін., 2018). Дещо вищими виявилися показники МІК щодо фітопатогенних бактерій поверхнево-активних рамноліпідів. Так, у роботі (Kim, Lee, & Hwang, 2000) було встановлено, що мінімальні інгібуючі концентрації рамноліпідів,

синтезованих *P. aeruginosa* B5 щодо фітопатогенів *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *R. solanacearum* та *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, які вражають більшість сільськогосподарських рослин, становили >50 мкг/мл. Sanchez із співавт. показали, що вирощування *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 і *P. syringae* pv. *tomato* AvrRPM1 за наявності 0,2 і 1 мг/мл рамноліпідів не спричиняло інгібування росту фітопатогенних бактерій (Sanchez та ін., 2012). У 2020 р. (Chopra та ін., 2020) було показано, що МІК щодо *X. campestris* дирамноліпиду, синтезованого *P. aeruginosa* RTE4 на глюкозі (2%) становила 5 мг/мл.

Слід зауважити, що протягом останніх років серед наукових праць стали з'являтися повідомлення про антимікробну активність ПАР, синтезованих у комплексі з фітогормонами (Chen, 2021; Chlebek, 2020; Ghadamgahi, 2022). Так, виділений з коренів ріпаку ендофіт *Pseudomonas fluorescens* BRZ63 утворював рамноліпиди, ІОК (59,62 мкг/мл), сідерофори, саліцилову кислоту (Chlebek, Pinski, Żur, Michalska, & Hupert-Kocurek, 2020). За дії метаболітів штаму BRZ63 ступінь інгібування росту фітопатогенних грибів *Colletotrichum dematium* K, *Rhizoctonia solani* W70, *Sclerotinia sclerotiorum* K2291 та *Fusarium avenaceum* становив від 37 до 62%. У 2021 р. було опубліковано роботу (Chen, Zhang, Zhao, Xiang, Yao, 2021), в якій повідомляється про здатність *Bacillus atrophaeus* B44 одночасно синтезувати комплекс аміноліпідів (422,6-446,9 мг/л) з антифунгальною активністю та біологічно активний гіберелін ГК₃ (7,7-23,1 мг/л). Ліпопептиди штаму B44 проявляли антимікробну активність щодо *R. solani* (зона інгібування росту 16 мм). Якісний склад комплексу аміноліпідів і рівень синтезу гібереліну залежав від складу поживного середовища (наявності певних солей та мікроелементів).

На відміну від досліджуваних нами штамів, які синтезують фітогормони і ПАР, яким притаманна висока антибактеріальна щодо фітопатогенів активність, описані у роботах (Chen, 2021; Chlebek, 2020) ПАР спричиняють

лише антифунгальну дію.

Зазначимо, що серед проаналізованої літератури тільки в одній роботі (Ghadamgahi та ін., 2022) автори встановили антимікробну щодо фітопатогенних бактерій активність ПАР, синтезованих бактеріями, здатними до утворення фітогормонів. Так, за наявності ПАР-вмісного супернатанту спостерігали інгібування росту *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* PVCT156.1.1 і *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* NCPPB432, проте показники антимікробної активності у статті не наведено. Одночасно з ПАР, наявність якого дослідники встановлювали за якісною реакцією, ізольований з ризосфери здорових томатів штам *P. aeruginosa* FG106 утворював ІОК (211 мкг/мл).

Також слід відзначити, що зараз у доступній літературі немає інформації про одночасний синтез поверхнево-активних речовин з антибактеріальною щодо фітопатогенів активністю та комплексу фітогормонів (ауксинів, цитокінінів та біологічно активних гіберелінів), як це встановлено для досліджуваних нами штамів *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *N. vaccinii* IMB B-7405 й *A. calcoaceticus* IMB B-7241.

Для розробки інтегрованої біотехнології синтезу фітогормонів і поверхнево-активних речовин з метою використання у рослинництві було обрано штам *N. vaccinii* IMB B-7405, оскільки він характеризувався найвищою здатністю до синтезу фітогормонів (5805,98 мкг/л на середовищі з відпрацьованою олією і 300 мг/л триптофану, див. табл. 4.1), а також високою антимікробною активністю (МІК становили до 0,7 мкг/мл, див табл. 5.2).

Обробка рослин томатів екзометаболітами *N. vaccinii* IMB B-7405, одержаними при культивуванні на середовищі з триптофаном, позитивно впливала на врожайність томатів. Найкращі показники (збільшення загальної ваги томатів на 80-90%) спостерігали з розведення як супернатанту, так і культуральної рідини у 400 разів, що підтверджує одержані раніше дані щодо

ефективної концентрації фітогормонів (див. розділ 3). Одержані результати є важливими, оскільки препарат можна використовувати у вигляді культуральної рідини (це доцільніше з економічної точки зору, оскільки немає необхідності відділяти біомасу) або у вигляді супернатанту (він утворюється внаслідок осадження клітин з метою виділення поверхнево-активних речовин).

На наступному етапі для підтвердження можливості використання ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 для контролю чисельності фітопатогенів у вегетаційних умовах, як тест-культури обрали *X. vesicatoria* IMB-9098 та *C. michiganensis* IMB-10₂. Ці патогени протягом своєї взаємодії з рослинами уражають, перш за все, листя, у зв'язку з чим можливо провести візуальну оцінку інтенсивності перебігу захворювання. Результати наших досліджень показали відсутність зараження протягом 7 діб на листі, попередньо обробленому розчином ПАР (див. рис. 5.1, 5.2). Завдяки цьому можемо припустити, що обробка рослин томатів екзометаболітами штаму IMB B-7405 допоможе захистити їх від ураження фітопатогенами.

Зазначимо, що у літературі (Ghadamgahi, 2022; Bolivar-Anillo, 2021; Tomar, 2014) є схожа інформація про використання аналогічних модельних систем для дослідження здатності продуцентів ПАР і фітогормонів знижувати ураження фітопатогенами листя сільськогосподарських культур. Проте у цих роботах досліджували виключно антифунгальну активність ПАР. Протягом останніх двох десятиліть захист овочевих культур від бактеріозів став однією з нагальних проблем через їх високе поширення і шкідливість. Бактеріальні захворювання спричиняють значні економічні втрати сільському господарству, оскільки вони впливають практично на всі види рослин.

У роботі (Tomar та ін., 2014) встановлено, що попередня обробка листя картоплі ПАР-вмісним супернатантом *P. aeruginosa* 1, або суспензією клітин продуцента ПАР дала змогу знизити майже на 100 % ураження листя фітопатогенним грибом *Phytophthora infestans*. Попередня інокуляція листя квасолі суспензією *B. subtilis* (продуцентів ліпопептидів і фітогормонів) приводила лише до появи слабких симптомів ураження *Botrytis cinerea* B05.10 (Bolivar-Anillo та ін., 2021). Обробка листя картоплі та полуниці суспензією *P. aeruginosa* FG106 (продуцента рамноліпідів і ауксинів) дала змогу зменшити зону інфікування *B. cinerea*, *P. infestans* і *Phytophthora colocasiae* з 1,6-2,1 см² у контрольних варіантах (обробка фосфатно-сольовим буфером) до 0,1-0,2 см² (Ghadamgahi та ін., 2022).

Отже, аналіз літературних даних підтверджує можливість розробки інтегрованої безвідходної технології з використанням штамів *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *N. vaccinii* IMB B-7405, а також *A. calcoaceticus* IMB B-7241, яка дасть змогу отримати в одному технологічному процесі комплексні мікробні біопрепарати, які матимуть різні біологічні властивості. Так, після відділення біомаси з метою одержання препаратів ПАР, отриманий супернатант культуральної рідини може бути використаний у двох напрямках: з метою виділення поверхнево-активних речовин, які володіють антиадгезивними та антимікробними властивостями (у ту ж чергу, і щодо фітопатогенних бактерій), або як препарат для використання у сільському господарстві з метою стимуляції росту рослин (завдяки наявності фітогормонів ауксинової, цитокінінової і гіберелової природи) та контролю чисельності фітопатогенів (завдяки наявності ПАР). Крім того, препарат може бути використаний для підвищення врожайності у вигляді культуральної рідини без попереднього відділення біомаси.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що найвищий приріст врожаю (+83%) досягався за обробки насіння ячменю розведеним у 20 разів супернатантом штаму *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017. Найбільший приріст сумарної ваги плодів при обробці кореневої системи рослин томатів (+145%) спостерігали за обробки фітогормональними екстрактами *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 (розведення 1:3000), а при обробці кореневої системи перців (+77%) – за обробки фітогормональними екстрактами *N. vaccinii* ІМВ В-7405 (розведення 1:10000).
2. Максимальний синтез ауксинів *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, *N. vaccinii* ІМВ В-7405, а також *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 досягався за концентрації триптофану 300 мг/л. Найвища концентрація ауксинів, синтезованих штамами ІМВ В-7405, ІМВ Ас-5017 і ІМВ В-7241 становила 5805,98; 5634,22 і 4850,98 мкг/мл відповідно, у той час як без триптофану не перевищувала 13–175 мкг/мл. Інтенсифікація синтезу ауксинів корелювала з активністю в клітинах штамів-продуцентів триптофантрансамінази (ключовий фермент індол-3-піруватного шляху утворення цих фітогормонів): при культивуванні без триптофану активність становила 138–163 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка, а за наявності попередника підвищувалася у в 3,8–5,1 разів (до 526–833 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка).
3. Показано, що концентрація ПАР, утворених *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, *N. vaccinii* ІМВ В-7405, а також *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, перебувала в межах 1,50–1,90 г/л незалежно від наявності триптофану в середовищі культивування. За наявності 300 мг/л триптофану в середовищі культивування штамів ІМВ В-7405 і ІМВ Ас-5017 мінімальні інгібуючі концентрації щодо фітопатогенних бактерій

становили всього 0,7–45 мкг/мл, у той час як без триптофану були у 2–4 рази вищими.

4. Здатність ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 до біоконтролю чисельності фітопатогенних бактерій встановлено не лише у дослідженнях *in vitro*, але й *in vivo*. На обробленому розчинами ПАР листі вегетативних рослин томатів, ураженому збудниками їх бактеріозів, упродовж 7 діб не було виявлено жодних проявів захворювання, у той же час ступінь ураження фітопатогенами необробленого листа становив від 8 до 50%.
5. Показано, що за обробки рослин томатів екзометаболітами *N. vaccinii* IMB B-7405, синтезованими за наявності триптофану, підвищувалися показники врожайності: найбільший приріст як загальної ваги томатів (82-91 %), так і середньої ваги плоду (12-18%) спостерігали у випадку використання супернатанту і культуральної рідини, розведених у 400 разів.
6. Отримані дані свідчать про значний потенціал використання комплексних препаратів, які містять поверхнево-активні речовини та фітогормони, у сільському господарстві. Ці препарати можуть успішно застосовуватися для стимуляції росту сільськогосподарських культур та контролю чисельності фітопатогенів. Крім того, використання відпрацьованої олії та відходів виробництва біодизелю як субстратів дає змогу не тільки підвищити ефективність таких інтегрованих технологій, а й вирішити проблему утилізації токсичних промислових відходів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

Abdallah, D. B., Tounsi, S., Gharsallah, H., Hammami, A., & Frikha-Gargouri, O. (2018). Lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain 32a as promising biocontrol compounds against the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 36518-36529. doi: 10.1007/s11356-018-3570-1

Adeniji, A. A., Aremu, O. S., & Babalola, O. O. (2019). Selecting lipopeptide-producing, Fusarium-suppressing *Bacillus* spp.: Metabolomic and genomic probing of *Bacillus velezensis* NWUMFkBS10. 5. *MicrobiologyOpen*, 8(6), e00742. doi: 10.1002/mbo3.742

Ahirwar, N. K., Gupta, G., Singh, V., Rawlley, R. K., & Ramana, S. (2015). Influence on growth and fruit yield of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants by inoculation with *Pseudomonas fluorescence* (SS5): Possible role of plant growth promotion. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(2), 720-730.

Ambawade, M. S., & Pathade, G. R. (2015). Production of indole acetic acid (IAA) by *Stenotrophomonas maltophilia* BE25 isolated from roots of banana (*Musa* spp.). *International Journal of Science and Research*, 4(1), 2644-2650.

Aragón, I. M., Pérez-Martínez, I., Moreno-Pérez, A., Cerezo, M., & Ramos, C. (2014). New insights into the role of indole-3-acetic acid in the virulence of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *FEMS microbiology letters*, 356(2), 184-192. doi: 10.1111/1574-6968.12413

Azadikhah, M., Jamali, F., Nooryazdan, H. R., & Bayat, F. (2019). Growth promotion and yield enhancement of barley cultivars using ACC deaminase producing *Pseudomonas fluorescens* strains under salt stress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 17(1), e0801. doi: 10.5424/sjar/2019171-13828

Azaiez, S., Slimene, I. B., Karkouch, I., Essid, R., Jallouli, S., Djebali, N., ... & Tabbene, O. (2018). Biological control of the soft rot bacterium *Pectobacterium*

carotovorum by *Bacillus amyloliquefaciens* strain Ar10 producing glycolipid-like compounds. *Microbiological Research*, 217, 23-33. doi: 10.1016/j.micres.2018.08.013.

Babu, A.N., Jogaiah, S., Ito, S.I., Nagaraj, A.K., & Tran, L.S.P. (2015). Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase. *Plant Science*, 231, 62–73. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.11.006.

Bolivar-Anillo, H. J., González-Rodríguez, V. E., Cantoral, J. M., García-Sánchez, D., Collado, I. G., & Garrido, C. (2021). Endophytic bacteria *Bacillus subtilis*, isolated from *Zea mays*, as potential biocontrol agent against *Botrytis cinerea*. *Biology*, 10(6), 492. doi: 10.3390/biology10060492

Bose, A., Kher, M. M., Nataraj, M., & Keharia, H. (2016). Phytostimulatory effect of indole-3-acetic acid by *Enterobacter cloacae* SN19 isolated from *Teramnus labialis* (L. f.) Spreng rhizosphere. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 6, 128-137. doi: 10.1016/j.bcab.2016.03.005. doi: 10.1016/j.bcab.2016.03.005.

Buensanteai, N., Yuen, G. Y., & Prathuangwong, S. (2008). The biocontrol bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 produces auxin, surfactin and extracellular proteins for enhanced growth of soybean plant. *Thai J Agric Sci*, 41(3-4), 101-116.

Bunsangiam, S., Sakpuntoon, V., Srisuk, N., Ohashi, T., Fujiyama, K., & Limtong, S. (2019). Biosynthetic pathway of indole-3-acetic acid in basidiomycetous yeast *Rhodospiridiobolus fluvialis*. *Mycobiology*, 47(3), 292-300. doi: 10.1080/12298093.

Cao, Y., Pi, H., Chandrangsu, P., Li, Y., Wang, Y., Zhou, H., ... & Cai, Y. (2018). Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific reports*, 8(1), 4360. doi: 10.1038/s41598-018-22782-z.

Cerboneschi, M., Decorosi, F., Biancalani, C., Ortenzi, M. V., Macconi, S., Giovannetti, L., ... & Tegli, S. (2016). Indole-3-acetic acid in plant–pathogen interactions: a key molecule for in planta bacterial virulence and fitness. *Research in microbiology*, 167(9-10), 774-787. doi: 10.1016/j.resmic.2016.09.002.

Chandra, S., Askari, K., & Kumari, M. (2018). Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 581-586. doi: 10.1016/j.jgeb.2018.09.001.

Chen, L., Zhang, H., Zhao, S., Xiang, B., & Yao, Z. (2021). Lipopeptide production by *Bacillus atrophaeus* strain B44 and its biocontrol efficacy against cotton rhizoctoniosis. *Biotechnology Letters*, 43, 1183-1193. doi: 10.1007/s10529-021-03114-0

Chen, M., Wang, J., Liu, B., Zhu, Y., Xiao, R., Yang, W., ... & Chen, Z. (2020). Biocontrol of tomato bacterial wilt by the new strain *Bacillus velezensis* FJAT-46737 and its lipopeptides. *BMC microbiology*, 20(1), 1-12. doi: 10.1186/s12866-020-01851-2

Chlebek, D., Pinski, A., Żur, J., Michalska, J., & Hupert-Kocurek, K. (2020). Genome mining and evaluation of the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* BRZ63, a new endophyte of oilseed rape (*Brassica napus* L.) against fungal pathogens. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8740. doi: 10.1186/s12866-020-01851-2

Chopra, A., Bobate, S., Rahi, P., Banpurkar, A., Mazumder, P. B., & Satpute, S. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* RTE4: A tea rhizobacterium with potential for plant growth promotion and biosurfactant production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 861.. doi: 10.3389/fbioe.2020.00861

Costacurta, A., & Vanderleyden, J. (1995). Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical reviews in microbiology*, 21(1), 1-18. doi: 10.3109/10408419509113531.

Dasri, K., Kaewharn, J., Kanso, S., & Sangchanjiradet, S. (2014). Optimization of indole-3-acetic acid (IAA) production by rhizobacteria isolated from epiphytic orchids. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 19, 268-268.

Ding, L., Zhang, S., Guo, W., & Chen, X. (2018). Exogenous indole regulates lipopeptides biosynthesis in Antarctic *Bacillus amyloliquefaciens* Pc3. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(5): 784-795. doi: 10.4014/jmb.1712.12014.

Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106, 85-125. doi: 10.1007/s10482-013-0095-y.

Duca, D. R., Rose, D. R., & Glick, B. R. (2018). Indole acetic acid overproduction transformants of the rhizobacterium *Pseudomonas* sp. UW4. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 111, 1645-1660. doi: 10.1007/s10482-018-1051-7.

Estenson, K., Hurst, G. B., Standaert, R. F., Bible, A. N., Garcia, D., Chourey, K., ... & Morrell-Falvey, J. L. (2018). Characterization of indole-3-acetic acid biosynthesis and the effects of this phytohormone on the proteome of the plant-associated microbe *Pantoea* sp. YR343. *Journal of proteome research*, 17(4), 1361-1374. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00708.

Fenibo, E. O., Ijoma, G. N., Selvarajan, R., & Chikere, C. B. (2019). Microbial surfactants: The next generation multifunctional biomolecules for applications in the petroleum industry and its associated environmental remediation. *Microorganisms*, 7(11), 581. doi: 10.3390/microorganisms7110581

Feoktistova, N. V., Mardanova, A. M., Khadieva, G. F., & Sharipova, M. R. (2016). Rhizospheric bacteria. *Scientists records of Kazan University. Natural sciences series*. 158(2), 207–224.

Fu, S. F., Sun, P. F., Lu, H. Y., Wei, J. Y., Xiao, H. S., Fang, W. T., ... & Chou, J. Y. (2016). Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. *Fungal biology*, 120(3), 433-448. doi: 10.1016/j.funbio.2015.12.006

Ghadamgahi, F., Tarighi, S., Taheri, P., Saripella, G. V., Anzalone, A., Kalyandurg, P. B., ... & Vetukuri, R. R. (2022). Plant growth-promoting activity of *Pseudomonas aeruginosa* FG106 and its ability to act as a biocontrol agent against potato, tomato and taro pathogens. *Biology*, 11(1), 140. doi: 10.3390/biology11010140

Ghosh, P. K., Sen, S. K., & Maiti, T. K. (2015). Production and metabolism of IAA by *Enterobacter* spp. (Gammaproteobacteria) isolated from root nodules of a legume *Abrus precatorius* L. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(3), 296-303. doi: 10.1016/j.bcab.2015.04.002/

Gravel, V., Antoun, H., & Tweddell, R.J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), 1968–1977. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.02.015>

Guo, D., Kong, S., Chu, X., Li, X., & Pan, H. (2019). De novo biosynthesis of indole-3-acetic acid in engineered *Escherichia coli*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(29), 8186-8190. doi: 10.1021/acs.jafc.9b02048.

Hasuty, A., Choliq, A., & Hidayat, I. (2018). Production of indole acetic acid (IAA) by *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* and *Rhodococcus* aff. *qingshengii*. *Int J Agric Technol*, 14(3), 299-312.

Hazarika, D. J., Goswami, G., Gautom, T., Parveen, A., Das, P., Barooah, M., & Boro, R. C. (2019). Lipopeptide mediated biocontrol activity of endophytic *Bacillus subtilis* against fungal phytopathogens. *BMC microbiology*, 19(1), 1-13. doi: 10.1186/s12866-019-1440-8.

Hori, K., Ichinohe, R., Unno, H., & Marsudi, S. (2011). Simultaneous syntheses of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* IFO3924 at various temperatures and from various fatty acids. *Biochemical Engineering Journal*, 53(2), 196-202. doi: 10.1016/j.bej.2010.10.011.

Huang, Y. Y., Cho, S. T., Lo, W. S., Wang, Y. C., Lai, E. M., & Kuo, C. H. (2015). Complete genome sequence of *Agrobacterium tumefaciens* Ach5. *Genome announcements*, 3(3), 10-1128. doi:10.1128/genomeA.00570-15.

Hungria, M., Campo, R. J., Souza, E. M., & Pedrosa, F. O. (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and soil*, 331, 413-425. doi: 10.1007/s11104-009-0262-0

Ignatova, L., Usmanova, A., Brazhnikova, Y., Omirbekova, A., Egamberdieva, D., Mukasheva, T., ... & Goncharova, A. (2022). Plant probiotic endophytic *Pseudomonas flavescens* D5 strain for protection of barley plants from salt stress. *Sustainability*, 14(23), 15881. doi: 10.3390/su142315881

Imada, E. L., de Oliveira, A. L. M., Hungria, M., & Rodrigues, E. P. (2017). Indole-3-acetic acid production via the indole-3-pyruvate pathway by plant growth promoter *Rhizobium tropici* CIAT 899 is strongly inhibited by ammonium. *Research in Microbiology*, 168(3), 283-292. doi: 10.1016/j.resmic.2016.10.010.

Jayakumar, A., Krishna, A., Mohan, M., Nair, I. C., & Radhakrishnan, E. K. (2019). Plant growth enhancement, disease resistance, and elemental modulatory effects of plant probiotic endophytic *Bacillus* sp. Fcl1. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11, 526-534. doi: 10.1007/s12602-018-9417-8

Jeyanthi, V., & Ganesh, P. (2013). Production, optimization and characterization of phytohormone indole acetic acid by *Pseudomonas fluorescence*. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*, 4(3), 514-520.

Joo, G.J., Kim, Y.M., Lee, I.J., Song, K.S., & Rhee, I.K. (2004). Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. *Biotechnology Letters*, 26(6), 487–491. doi: 10.1023/b:bile.0000019555.87121.34

Kang S.M., Khan A.L., Waqas, M., You, Y.H., Hamayun, M., & Joo, G.J. (2015). Gibberellin-producing *Serratia nematodiphila* PEJ1011 ameliorates low

temperature stress in *Capsicum annuum* L. *European Journal of Soil Biology*, 68: 85–93. doi: 10.1016/j.ejsobi.2015.02.005

Khalid, A., Arshad, M., & Zahir, Z.A. (2004). Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3), 473–480. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02161.x

Kim, B. S., Lee, J. Y., & Hwang, B. K. (2000). In vivo control and in vitro antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 56(12), 1029–1035. doi: 10.1016/j.pestbp.2019.11.009

Kim, Y. M., Kwak, M. H., Kim, H. S., & Lee, J. H. (2019). Production of Indole-3-acetate in *Corynebacterium glutamicum* by Heterologous Expression of the Indole-3-pyruvate Pathway Genes. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 47(2), 242–249. doi: 10.4014/mb.1901.01013

Kochar, M., Upadhyay, A., & Srivastava, S. (2011). Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. *Research in microbiology*, 162(4), 426–435. doi: 10.1016/j.resmic.2011.03.006

Kolupaev YE, Karpets YV, Yastrebova TO, Lugovaya AA. (2016) [Signaling mediators in the realization of the physiological effects of stress phytohormones]. *Journal of Kharkov National Agrarian University. Biology series*, 1(37):42–62.

Krishnan, S., Manigundan, K., Gautam, R. K., Singh, P. K., Nakkeeran, S., & Sharma, S. K. (2019). *Bacillus* spp. for suppression of eggplant bacterial wilt pathogen in Andaman Islands: Isolation and characterization. *Indian J Exp Biol*. 57: 131–37.

Kudoyarova, G., Arkhipova, T., Korshunova, T., Bakaeva, M., Loginov, O., & Dodd, I. C. (2019). Phytohormone mediation of interactions between plants and non-symbiotic growth promoting bacteria under edaphic stresses. *Frontiers in plant science*, 10, 1368. doi: 10.3389/fpls.2019.01368

Kumari, S., Prabha, C., Singh, A., Kumari, S., & Kiran, S. (2018). Optimization of indole-3-acetic acid production by diazotrophic *B. subtilis* DR2 (KP455653), isolated from rhizosphere of *Eragrostis cynosuroides*. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*, 7(2), 20-27. doi: 10.18178/ijpmb.7.2.20-27

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG): Methabolism of tryptophan in *Agrobacterium tumefaciens* Ach5. [Electronic resource] // Access mode: <https://www.genome.jp/pathway/atf00380>

Lacroix, B., Gizatullina, D. I., Babst, B. A., Gifford, A. N., & Citovsky, V. (2014). *Agrobacterium* T-DNA-encoded protein A tu6002 interferes with the host auxin response. *Molecular plant pathology*, 15(3), 275-283. doi:10.1111/mpp.12088

Lebrazi, S., Niehaus, K., Bednarz, H., Fadil, M., Chraibi, M., & Fikri-Benbrahim, K. (2020). Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization by rhizobacterial strains isolated from *Acacia cyanophylla* root nodules and their effects on its plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18, 1-12. doi: 10.1186/s43141-020-00090-2

Legault, G. S., Lerat, S., Nicolas, P., & Beaulieu, C. (2011). Tryptophan regulates thaxtomin A and indole-3-acetic acid production in *Streptomyces scabiei* and modifies its interactions with radish seedlings. *Phytopathology*, 101(9), 1045-1051. doi:10.1094/PHYTO-03-11-0064

Lehmann, T., Hoffmann, M., Hentrich, M., & Pollmann, S. (2010). Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: a widely distributed way of indole-3-acetic acid production?. *European journal of cell biology*, 89(12), 895-905. doi: 10.1016/j.ejcb.2010.06.021

Le, K. D., Kim, J., Yu, N. H., Kim, B., Lee, C. W., & Kim, J. C. (2020). Biological control of tomato bacterial wilt, kimchi cabbage soft rot, and red pepper

bacterial leaf spot using *Paenibacillus elgii* JCK-5075. *Frontiers in Plant Science*, 11, 775. doi: 10.3389/fpls.2020.00775

Lin, H. R., Shu, H. Y., & Lin, G. H. (2018). Biological roles of indole-3-acetic acid in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiological research*, 216, 30-39. doi: 10.1016/j.micres.2018.08.004

Lin, L., & Xu, X. (2013). Indole-3-acetic acid production by endophytic *Streptomyces* sp. En-1 isolated from medicinal plants. *Current microbiology*, 67, 209-217. doi: 10.1007/s00284-013-0348-z

Liu, D., Yan, R., Fu, Y., Wang, X., Zhang, J., & Xiang, W. (2019). Antifungal, plant growth-promoting, and genomic properties of an endophytic actinobacterium *Streptomyces* sp. NEAU-S7GS2. *Frontiers in microbiology*, 10, 2077. doi: 10.3389/fmicb.2019.02077

Liu, W. H., Chen, F. F., Wang, C. E., Fu, H. H., Fang, X. Q., Ye, J. R., & Shi, J. Y. (2019). Indole-3-acetic acid in *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007: Enzymatic identification of the indole-3-acetamide synthesis pathway. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2559. doi: 10.3389/fmicb.2019.02559

Luo, K., Rocheleau, H., Qi, P. F., Zheng, Y. L., Zhao, H. Y., & Ouellet, T. (2016). Indole-3-acetic acid in *Fusarium graminearum*: Identification of biosynthetic pathways and characterization of physiological effects. *Fungal biology*, 120(9), 1135-1145. doi:10.1016/j.funbio.2016.06.002

Luziatelli, F., Ficca, A. G., Bonini, P., Muleo, R., Gatti, L., Meneghini, M., ... & Ruzzi, M. (2020). A genetic and metabolomic perspective on the production of indole-3-acetic acid by *Pantoea agglomerans* and use of their metabolites as biostimulants in plant nurseries. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1475. doi: 10.3389/fmicb.2020.01475

Manulis, S., Shafrir, H., Epstein, E., Lichter, A., & Barash, I. (1994). Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in

Streptomyces spp. *Microbiology*, 140(5), 1045-1050. doi: 10.1099/13500872-140-5-1045

McClerklin, S. A., Lee, S. G., Harper, C. P., Nwumeh, R., Jez, J. M., & Kunkel, B. N. (2018). Indole-3-acetaldehyde dehydrogenase-dependent auxin synthesis contributes to virulence of *Pseudomonas syringae* strain DC3000. *PLoS pathogens*, 14(1), e1006811. doi: 10.1371/journal.ppat.1006811

Mogilnaya, O. M., Rud, V. P., Khareba, O. V., Horova, T. K., Kuts, O. V., Terokhina, L. A., & Sydora, V. V. (2018). Priority of scientific directions of software manufacturing of small views of vegetable plants in Ukraine. *Vegetable and Melon Growing*, 64, 75-88. doi: 10.32717/0131-0062-2018-64-75-88

Molina, R., Rivera, D., Mora, V., López, G., Rosas, S., Spaepen, S., ... & Cassán, F. (2018). Regulation of IAA biosynthesis in *Azospirillum brasilense* under environmental stress conditions. *Current microbiology*, 75, 1408-1418. doi: 10.1007/s00284-018-1537-6

Mon Myo, E. M., Ge, B., Ma, J., Cui, H., Liu, B., Shi, L., ... & Zhang, K. (2019). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces fradiae* NKZ-259 and its formulation to enhance plant growth. *BMC microbiology*, 19, 1-14. doi: 10.1186/s12866-019-1528-1

Monnier, N., Furlan, A., Botcazon, C., Dahi, A., Mongelard, G., Cordelier, S., ... & Rippa, S. (2018). Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* are elicitors triggering *Brassica napus* protection against *Botrytis cinerea* without physiological disorders. *Frontiers in Plant Science*, 1170. doi: 10.3389/fpls.2018.01170

Naveed, M., Qureshi, M. A., Zahir, Z. A., Hussain, M. B., Sessitsch, A., & Mitter, B. (2015). L-Tryptophan-dependent biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) improves plant growth and colonization of maize by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Annals of microbiology*, 65, 1381-1389. doi: 10.1007/s13213-014-0976-y

Nitschke, M., Costa, S. G., & Contiero, J. (2011). Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. *Process Biochemistry*, 46(3), 621-630. doi: 10.1016/j.procbio.2010.12.012

Nutaratat, P., Monprasit, A., & Srisuk, N. (2017). High-yield production of indole-3-acetic acid by *Enterobacter* sp. DMKU-RP206, a rice phyllosphere bacterium that possesses plant growth-promoting traits. *3 Biotech*, 7, 1-15. doi: 10.1007/s13205-017-0937

Nutaratat, P., Srisuk, N., Arunrattiyakorn, P., & Limtong, S. (2016). Indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in the basidiomycetous yeast *Rhodospiridium paludigenum*. *Archives of microbiology*, 198, 429-437. doi: 10.1007/s00203-016-1202-z

Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 1-16. doi: 10.1007/s11274-017-2364-9

Ouyang, L., Pei, H., & Xu, Z. (2017). Low nitrogen stress stimulating the indole-3-acetic acid biosynthesis of *Serratia* sp. ZM is vital for the survival of the bacterium and its plant growth-promoting characteristic. *Archives of microbiology*, 199, 425-432. doi: 10.1007/s00203-016-1312-7

Ozdal, M., Ozdal, O. G., Sezen, A., Algur, O. F., & Kurbanoglu, E. B. (2017). Continuous production of indole-3-acetic acid by immobilized cells of *Arthrobacter agilis*. *3 Biotech*, 7, 1-6. doi: 10.1007/s13205-017-0605-0

Pan, L., Chen, J., Ren, S., Shen, H., Rong, B., Liu, W., & Yang, Z. (2020). Complete genome sequence of *Mycobacterium* Mya-zh01, an endophytic bacterium, promotes plant growth and seed germination isolated from flower stalk of *Doritaenopsis*. *Archives of Microbiology*, 202(7), 1965-1976. doi: 10.1007/s00203-020-01924-w

Parasuraman, P., Pattnaik, S. S., Busi, S., Marraiki, N., Elgorban, A. M., & Syed, A. (2022). Isolation and characterization of plant growth promoting

rhizobacteria and their biocontrol efficacy against phytopathogens of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 156(1), 164-170. doi: 10.1080/11263504.2020.1845842

Passari, A. K., Chandra, P., Mishra, V. K., Leo, V. V., Gupta, V. K., Kumar, B., & Singh, B. P. (2016). Detection of biosynthetic gene and phytohormone production by endophytic actinobacteria associated with *Solanum lycopersicum* and their plant-growth-promoting effect. *Research in microbiology*, 167(8), 692-705. doi: 10.1016/j.resmic.2016.07.001.

Pirog, T. P., Leonova, N. O., Shevchuk, T. A., Panasuk, E. V., Beregovaya, K. A., & Iutynskaya, G. A. (2015) [Synthesis of phytohormones by *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 – producer of surfactants]. *Mikrobiolohichni Zhurnal*, 77(6), 21-30.

Pirog, T. P., Havrylkina, D. V., Leonova, N. O., Shevchuk, T. A., & Iutynska, G. O. (2019a). Synthesis of Biologically Active Gibberellins GA₄ and GA₇ by Microorganisms. *Mikrobiologichni Zhurnal*, 81(2), 90-109. doi: 10.15407/microbiolj81.02.090

Pirog, T.P., Kliuchka, L.V., Klymenko, N.O., Shevchuk, T.A., & Iutynska, G.O. (2019b) Integrated Technologies of Microbial Synthesis of Several Final Products. *Mikrobiologichni Zhurnal*, 81(6):110-130. doi: 10.15407/microbiolj81.06.110

Pirog, T.P., Kliuchka, L.V., Shevchuk, T.A., & Muchnyk F.V. (2019c) Interrelation of Chemical Composition and Biological Properties of Microbial Surfactants. *Mikrobiologichni Zhurnal* 81(3):84-104. doi: 10.15407/microbiolj81.03.084

Pirog, T. P., Konon, A. D., Sofilkanich, A. P., & Iutinskaya, G. A. (2013). Effect of surface-active substances of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, and *Nocardia vaccinii* K-8 on phytopathogenic bacteria. *Applied biochemistry and microbiology*, 49, 360-367. doi: 10.1134/S000368381304011X

Pirog, T., Piatetska, D., Yarova, H., & Iutynska, G. (2021). Effect on phytopathogenic microorganisms of surfactants of microbial origin. *Mikrobiologichnii Zhurnal*, 83(6):75-94. doi: 10.15407/microbiolj83.06.075

Gvozdyak, R. I., Pasichnik, L. A., Yakovleva, L. M., Moroz, S. M., Litvinchuk, O. O., Zhitkevich, N. V., ... & Patyka, V. F. (2011). Phytopathogenic bacteria. Bacterial plant diseases. Kyiv: *OOO NVP Interservis*. 444 p.

Que, Y., Sun, S., Xu, L., Zhang, Y., & Zhu, H. (2014). High-level coproduction, purification and characterisation of laccase and exopolysaccharides by *Coriolus versicolor*. *Food chemistry*, 159, 208-213. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.063

Rivera, D., Mora, V., Lopez, G., Rosas, S., Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Cassan, F. (2018). New insights into indole-3-acetic acid metabolism in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Applied Microbiology*, 125(6), 1774-1785. doi: 10.1111/jam.14080

Riyanti, E. I., Susilowati, D. N., Mulya, K., & Listanto, E. (2019). Growth improvement of tomato with the application of bacterial isolates producing indole acetic acid (IAA) and phosphate solubilizer. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 20(1), 35. doi: 10.21082/ijas.v20n1.2019.p35-42

Rodrigues, A. I., Gudiña, E. J., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2017). Sodium chloride effect on the aggregation behaviour of rhamnolipids and their antifungal activity. *Scientific Reports*, 7(1), 12907. doi: 10.1038/s41598-017-13424-x

Rodrigues, E. P., Soares, C. D. P., Galvão, P. G., Imada, E. L., Simões-Araújo, J. L., Rouws, L. F., ... & Baldani, J. I. (2016). Identification of genes involved in indole-3-acetic acid biosynthesis by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 strain using transposon mutagenesis. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1572. doi: 10.3389/fmicb.2016.01572

Sabaté, D. C., Brandan, C. P., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., & Audisio, M. C. (2018). Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. *Microbiological research*, 211, 21-30. doi: 10.1016/j.micres.2018.04.003

Sanchez, L., Courteaux, B., Hubert, J., Kauffmann, S., Renault, J. H., Clément, C., ... & Dorey, S. (2012). Rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in *Arabidopsis* and highlight a central role for salicylic acid. *Plant physiology*, 160(3), 1630-1641. doi: 10.1104/pp.112.201913

Sha, R., & Meng, Q. (2016). Antifungal activity of rhamnolipids against dimorphic fungi. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 62(5), 233-239. doi: 10.2323/jgam.2016.04.004

Shim, J., Kim, J. W., Shea, P. J., & Oh, B. T. (2015). IAA production by *Bacillus* sp. JH 2-2 promotes Indian mustard growth in the presence of hexavalent chromium. *Journal of basic microbiology*, 55(5), 652-658. doi: 10.1002/jobm.201400311

Sousa, J. A. D. J., & Olivares, F. L. (2016). Plant growth promotion by streptomycetes: ecophysiology, mechanisms and applications. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 1-12. doi: 10.1186/s40538-016-0073-5

Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, 31(4), 425-448. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x

Sun, S. L., Yang, W. L., Fang, W. W., Zhao, Y. X., Guo, L., & Dai, Y. J. (2018). The plant growth-promoting rhizobacterium *Variovorax boronicumulans* CGMCC 4969 regulates the level of indole-3-acetic acid synthesized from indole-3-acetonitrile. *Applied and environmental microbiology*, 84(16), e00298-18. doi:10.1128/AEM.00298-18

Tomar, S., Singh, B. P., Lal, M., Khan, M. A., Hussain, T., Sharma, S., ... & Kumar, S. (2014). Screening of novel microorganisms for biosurfactant and biocontrol activity against *Phytophthora infestans*. *Journal of environmental biology*, 35(5), 893.

Torres, D., Benavidez, I., Donadio, F., Mongiardini, E., Rosas, S., Spaepen, S., ... & Cassán, F. (2018). New insights into auxin metabolism in *Bradyrhizobium japonicum*. *Research in microbiology*, 169(6), 313-323. doi: 10.1016/j.resmic.2018.04.002

Tsavkelova, E., Oeser, B., Oren-Young, L., Israeli, M., Sasson, Y., Tudzynski, B., & Sharon, A. (2012). Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium species*. *Fungal Genetics and Biology*, 49(1), 48-57. doi: 10.1016/j.fgb.2011.10.005.

Tsygankova, V. A., Galkina, L. A., Musatenko, L. I., & Sytnik, K. M. (2005). Genetic and epigenetic control of plant growth and development. Genes of auxin biosynthesis and auxin-regulated genes controlling plant cell division and extension. *Biopolymers and Cell*, 21(2), 107-133. doi: 10.7124/bc.0006E2

Upadhyay, A., & Srivastava, S. (2008). Characterization of a new isolate of *Pseudomonas fluorescens* strain Psd as a potential biocontrol agent. *Letters in applied microbiology*, 47(2), 98-105. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02390.x

Upadhyay, A., & Srivastava, S. (2010). Evaluation of multiple plant growth promoting traits of an isolate of *Pseudomonas fluorescens* strain Psd. *Indian J. Exp. Biol.*, 48(6):601–609.

Wagi, S., & Ahmed, A. (2019). *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ*, 7, e7258. doi: 10.7717/peerj.7258

Wu, H., Yang, J., Shen, P., Li, Q., Wu, W., Jiang, X., ... & Qi, F. (2021). High-level production of indole-3-acetic acid in the metabolically engineered *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(6), 1916-1924. doi: 10.1021/acs.jafc.0c08141

Wu, T., Xu, J., Xie, W., Yao, Z., Yang, H., Sun, C., & Li, X. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* L10: a hydrocarbon-degrading, biosurfactant-producing, and plant-growth-promoting endophytic bacterium isolated from a reed (*Phragmites australis*). *Frontiers in microbiology*, 9, 1087. doi: 10.3389/fmicb.2018.01087

Yang, T., Shi, F., An, Y.,

Yang, T., Shi, F., An, Y., Sun, D., & Lu, Y. (2022). Isolation of a pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria and its growth-promoting effect on pepper plants. *Current Science*, 123, 214. doi: 10.5555/20220339972

Yashchuk, I., & Shlonchak, G. (2019) Experience of growing pine seedlings with the use of plant growth regulators in SE "Klavdievske Forestry". *Forestry and agroforestry*, 134, 43–46.

Zeng, W., Li, W., Shu, L., Yi, J., Chen, G., & Liang, Z. (2013). Non-sterilized fermentative co-production of poly (γ -glutamic acid) and fibrinolytic enzyme by a thermophilic *Bacillus subtilis* GXA-28. *Bioresource technology*, 142, 697-700. doi: 10.1016/j.biortech.2013.05.020.

Zhang, B. X., Wang, Y. Y., & Hu, X. (2020). Highly Efficient Biosynthesis of Indole-3-acetic acid by *Enterobacter xiangfangensis* BHW6. doi: 10.21203/rs.3.rs-54635/v1

Пирог, Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. Київ: НУХТ, 2010. 623 с.

Підгорський, В.С., Іутинська, Г.О., & Пирог Т.П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. Київ, 2010, 327 с.

Руденко В.М. Математична статистика. Київ: Центр учбової літератури, 2012. 304 с.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А. Акт впровадження результатів у навчальний процес

Міністерство освіти і науки України
Національний університет харчових технологій



Проректор з наукової роботи

Сергій ТОКАРЧУК

08 грудня 2024 р.

АКТ

впровадження результатів науково-дослідних, дослідно-конструкторських і дисертаційних робіт у навчальний процес вищих навчальних закладів

Замовник Національний університет харчових технологій в особі проректора з наукової роботи **ТОКАРЧУКА Сергія**, який діє на підставі наказу № 87 від 20.10.22 р. _____
(П.І. керівника)

Дійсним актом підтверджується, що результати:

проекту МОН фундаментальних наукових досліджень за рахунок видатків держаного бюджету (секція 24 «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології») _____
(найменування виду роботи)

Комплексні мікробні препарати мультифункціонального призначення: від регуляції біосинтезу та властивостей до перспектив практичного використання. Державний реєстраційний номер: 0119U002575 _____
(найменування теми, № держ. реєстрації)

виконаної _____ у проблемній науково-дослідній лабораторії _____
(найменування кафедри)

виконуваної з 1 січня 2019 _____ по 31 грудня 2021 _____
(термін виконання)

впроваджені у навчальний процес кафедри біотехнології і мікробіології у 2023 р. _____

1. Вид впроваджених результатів: одержання в одному біотехнологічному процесі комплексного мікробного препарату з різноманітними біологічними властивостями (для стимуляції росту рослин і контролю чисельності фітопатогенних бактерій).

2. Форма впровадження: нова навчальні дисципліни «Інтегровані мікробні технології», модулі навчальних дисциплін «Інтенсифікація технологій мікробного синтезу» та «Біотехнологічні студії» для підготовки докторів філософії за спеціальністю 162 «Біотехнології і біоінженерія».

3. Новизна результатів науково-дослідних робіт: На сучасному етапі на зміну класичним монобіотехнологіям, основним постулатом яких є «один продуцент –

один вуглецевий субстрат – один цільовий продукт» приходять так звані «інтегровані біотехнології» (один продуцент – один або кілька вуглецевих субстратів – кілька цільових продуктів). Ефективність таких технологій очевидна. По-перше, в результаті реалізації одного технологічного процесу замість кількох; по-друге, за рахунок того, що сфери застосування цільового продукту, що містить комплекс метаболітів з різними властивостями, є набагато ширшим порівняно з монопрепаратами. Особливої уваги заслуговують інтегровані технології, один з цільових продуктів яких сам по собі є метаболітом широкого спектру призначення, наприклад, поверхнево-активні речовини (ПАР), яким притаманний комплекс унікальних біологічних властивостей: антимікробна (у тому числі й щодо фітопатогенних бактерій) та антиадгезивна активність, здатність до руйнування біоплівки. Вперше встановлено здатність продуцентів поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 і *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 синтезувати фітогормони ауксинової, цитокінінової і гібереллової природи на токсичних промислових відходах (виробництва біодизелю та відпрацьованій олії). Встановлено можливість підвищення на один-два порядки кількості синтезованих ауксинів у разі внесення в олієвмісні середовища культивування штаму *N. vaccinii* IMB B-7405 невисоких (100-300 мг/л) концентрацій триптофану - попередника їх біосинтезу.

4. Перелік курсів і дисциплін, у рамках яких викладені результати НДР: Результати наукових досліджень увійшли до курсів лекцій з дисциплін «Загальна біотехнологія», «Загальна мікробіологія» для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр», «Природознавча мікробіологія» для здобувачів освітнього ступеня «магістр» спеціальності 162 «Біотехнології і біоінженерія», а також використані у курсовому та дипломному проектуванні.

5. Соціальний і науково-технічний ефект: Інтегровані біотехнології є безвідходними. Так, при одержанні препаратів ПАР осаджені клітини можуть бути використані для очищення води від нафти; отриманий супернатант культуральної рідини – для подальшого виділення ПАР з антиадгезивними і антимікробними (у тому числі, й щодо фітопатогенних бактерій) властивостями. Враховуючи, що у водній фазі, яка залишається після екстракції ПАР, містяться фітогормони ауксинової, цитокінінової і гібереллової природи, її можна використовувати для стимуляції росту мікроорганізмів і рослин. Перевагою мікробних ПАР як антимікробних агентів є механізм їх дії (порушення функцій цитоплазматичної мембрани), який унеможливилює виникнення резистентних форм бактерій.

Керівник НДР



(підпис)

(Пирог Т.П.)
(ініціали, прізвище)

«08» січня 2024 р.

ВИКОНАВЕЦЬ



(підпис)

(П'ятецька Д.В.)
(ініціали, прізвище)

«08» січня 2024 р.

ДОДАТОК Б. Патенти на винахід



		(11) 123216
(19) UA	(51) МПК (2021.01)	
	C12N 1/20 (2006.01)	A01P 1/00
	A01N 63/20 (2020.01)	A01P 21/00
	C12P 1/04 (2006.01)	C12R 1/01 (2006.01)
(21) Номер заявки:	а 2018 05121	(72) Винахідники: Пирог Тетяна Павлівна, UA, Леонова Наталія Осипівна, UA, Гаврилкіна Дар'я Володимирівна, UA, Антонюк Світлана Ігорівна, UA, Палійчук Олеся Ігорівна, UA
(22) Дата подання заявки:	10.05.2018	
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	04.03.2021	
(41) Дата публікації відомостей про заявку та номер Бюлетеня:	25.10.2018, Бюл. № 20	
(46) Дата публікації відомостей про державну реєстрацію та номер Бюлетеня:	03.03.2021, Бюл. № 9	(73) Володілець: НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Володимирська, 68, м. Київ, 01601, UA

(54) Назва винаходу:

СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КОМПЛЕКСНОГО МІКРОБНОГО ПРЕПАРАТУ

(57) Формула винаходу:

Спосіб одержання комплексного мікробного препарату, який містить поверхнево-активні речовини з антимікробною, антиадгезивною активністю, а також здатністю до руйнування біоплівки, та фітогормони ауксинової, цитокінінової та гіберелінової природи, згідно з яким штам *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 культивують у рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення 2 % суміші відпрацьованих соняшникових олій, одержаних після смаження м'яса, картоплі, риби, при цьому для одержання інокуляту використовують середовище з 1 % рафінованої соняшnikової олії.

УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА ВИНАХІД

№ 123217

СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КОМПЛЕКСНОГО МІКРОБНОГО
ПРЕПАРАТУ

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи
і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі України винаходів **03.03.2021.**

Генеральний директор
Державного підприємства
«Український інститут
інтелектуальної власності»

А.В. Кудін



(11) 123217		
(19) UA	(51) МПК (2021.01)	
	C12N 1/20 (2006.01)	A01P 1/00
	A01N 63/20 (2020.01)	A01P 21/00
	C12P 1/04 (2006.01)	C12R 1/01 (2006.01)
(21) Номер заявки:	а 2018 05122	(72) Винахідники: Пирог Тетяна Павлівна, UA, Леонова Наталія Осипівна, UA, Гаврилкіна Дар'я Володимирівна, UA, Антонюк Світлана Ігорівна, UA, Луцай Дар'я Андріївна, UA
(22) Дата подання заявки:	10.05.2018	
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	04.03.2021	
(41) Дата публікації відомостей про заявку та номер Бюлетеня:	25.10.2018, Бюл.№ 20	
(46) Дата публікації відомостей про державну реєстрацію та номер Бюлетеня:	03.03.2021, Бюл. № 9	(73) Володілець: НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Володимирська, 68, м. Київ-33, 01601, UA

(54) Назва винаходу:

СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КОМПЛЕКСНОГО МІКРОБНОГО ПРЕПАРАТУ

(57) Формула винаходу:

Спосіб одержання комплексного мікробного препарату, який містить поверхнево-активні речовини з антимікробною, антиадгезивною активністю, а також здатністю до руйнування біоплівки, та фітогормони ауксинової, цитокинінової та гіберелінової природи, згідно з яким штам *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 культивують у рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення 2 % суміші відпрацьованих соняшникових олій, одержаних після смаження м'яса, картоплі, риби, при цьому для одержання інокуляту використовують середовище з 1 % такої самої суміші відпрацьованих олій.

УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА ВІНАХІД

№ 121902

СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КОМПЛЕКСНОГО МІКРОБНОГО
ПРЕПАРАТУ

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи
і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на винаходи
10.08.2020.

Заступник Міністра розвитку
економіки, торгівлі та сільського
господарства України

Д.О. Романович



(11) **121902**

(19) **UA**

(51) МПК (2020.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

C05F 17/20 (2020.01)

A01N 63/20 (2020.01)

C12P 1/04 (2006.01)

A01P 3/00

A01P 21/00

C12R 1/365 (2006.01)

(21) Номер заявки: **а 2018 05127**

(22) Дата подання заявки: **10.05.2018**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.08.2020**

(41) Дата публікації відомостей про заявку та номер бюлетеня: **26.12.2018, Бюл. № 24**

(46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: **10.08.2020, Бюл. № 15**

(72) Винахідники:

**Пирог Тетяна Павлівна, UA,
Леонова Наталія Осипівна,
UA,
Гаврилкіна Дар'я
Володимирівна, UA,
Антонюк Світлана Ігорівна,
UA,
Герштман Артем Юрійович,
UA**

(73) Власник:

**НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ
ТЕХНОЛОГІЙ,
вул. Володимирська, 68, м.
Київ, 01601, UA**

(54) Назва винаходу:

СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КОМПЛЕКСНОГО МІКРОБНОГО ПРЕПАРАТУ

(57) Формула винаходу:

Спосіб одержання комплексного мікробного препарату, який містить поверхнево-активні речовини з антимікробною, антиадгезивною активністю, а також здатністю до руйнування біоплівки, та фітогормони ауксинової, цитокінінової та гіберелінової природи, що включає культивування штаму *Nocardia vaccini* IMB B-7405 у рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і суміш субстратів як джерело вуглецевого живлення, де як джерело вуглецю використовують суміш технічного гліцерину 1 % (об'ємна частка) та відпрацьовану після смаження картоплі олію 1 % (об'ємна частка).

ДОДАТОК В. Список публікацій за темою дисертації

Статті у періодичних виданнях інших держав

1. Leonova, N., Pirog, T., Piatetska, D., Shevchuk, T., Kharkhota, M., & Iutynska, G. (2020). Synthesis of gibberellins by surfactant producers *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017. *Scientific Study & Research – Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industr.* 21(4), 497–509.

<https://dspace.nuft.edu.ua/handle/123456789/41081>

«Scientific Study & Research: Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology. Food Industry» є закордонним виданням (Румунія), міжнародна індексація Web of Science.

Статті у наукових фахових виданнях України

2. Пирог, Т. П., П'ятецька, Д., Клименко, Н. О., Шевчук, Т. А., & Леонова, Н. О. (2019). Інтенсифікація синтезу ауксинів у продуцента поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. *Наукові праці НУХТ.* 25(6), 15-23.

<https://dspace.nuft.edu.ua/handle/123456789/32665>

«Наукові праці Національного університету харчових технологій» включений до переліку наукових фахових видань за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія, категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України № 975 від 11.07.2019); міжнародна індексація: Index Copernicus, EBSCOhost, Google Scholar.

3. Pirog, T., Leonova, N., Piatetska, D., Klymenko, N., & Shevchuk, T. (2020). Influence of tryptophan on auxin-synthesizing ability of surfactant producer *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241. *Ukrainian Food Journal*, 9(1), 175-262. doi: 10.24263/2304-974X-2020-9-1-15

https://www.researchgate.net/publication/341512563_Influence_of_tryptophan_on_auxin-

synthesizing_ability_of_surfactant_producer_Acinetobactercalcoaceticus_IMV_B-7241

«*Ukrainian Food Journal*» включений до переліку наукових фахових видань за спеціальністю 162-Біотехнології та біоінженерія, категорія А (Наказ Міністерства освіти і науки України № 358 від 15.03.2019); міжнародна індексація: *Web of Science, Google Scholar, Index Copernicus* та ін.

4. П'ятецька, Д., & Пирог, Т. (2023). Вплив екзометаболітів *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 і *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 на врожайність томатів, перців та ячменю. *Наукові праці НУХТ*. 29(5), 7-20. doi: 10.24263/2225-2924-2023-29-5-3

«*Наукові праці Національного університету харчових технологій*» включений до переліку наукових фахових видань за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія, категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України № 975 від 11.07.2019); міжнародна індексація: *Index Copernicus, EBSCOhost, Google Scholar*.

Статті у інших наукових виданнях

5. Pirog, T. P., Leonova, N. O., Piatetska, D. V., Klymenko, N. O., Zhdanyuk, V. I., & Shevchuk, T. A. (2020). Induction of auxins synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 with the addition of tryptophan to the cultivation medium. *Mikrobiolohichni Zhurnal*, 82(6), 3-12. doi: 10.15407/microbiolj82.06.003

<https://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/41090>

«*Mikrobiolohichni Zhurnal*» включено у перелік наукових фахових видань України за спеціальністю 091-Біологія, категорія А (Наказ Міністерства освіти і науки України № 1471 від 26.11.2020); міжнародна індексація: *Scopus*, кuartиль Q4.

6. Pirog, T. P., Piatetska, D. V., Yarova, H. A., & Iutynska, G. O. (2021). The effect of surfactants of microbial origin on phytopathogenic microorganisms. *Mikrobiolohichni Zhurnal*, 83(6), 75-94. doi: 10.15407/microbiolj83.06.075

https://www.researchgate.net/publication/357315904_The_Effect_of_Surfactants_of_Microbial-Origin_on_Phytopathogenic_Microorganisms

«*Mikrobiolohichni Zhurnal*» включено у перелік наукових фахових видань України за спеціальністю 091-Біологія, категорія А (Наказ Міністерства освіти і науки України № 1471 від 26.11.2020); міжнародна індексація: Scopus, квартиль Q4.

7. Pirog, T., Piatetska, D., Zhdanyuk, V., Leonova, N., & Shevchuk, T. (2022). Effect of tryptophane on synthesis of certain exometabolites by bacteria of genus *Acinetobacter*, *Nocardia*, and *Rhodococcus* and their properties. *Mikrobiolohichni Zhurnal*. 84(6), 50-61. doi: 10.15407/microbiolj84.06.050

<https://dspace.nuft.edu.ua/handle/123456789/41091>

«*Mikrobiolohichni Zhurnal*» включено у перелік наукових фахових видань України за спеціальністю 091-Біологія, категорія А (Наказ Міністерства освіти і науки України № 1471 від 26.11.2020); міжнародна індексація: Scopus, квартиль Q4.

8. Pirog, T., Piatetska, D., Klymenko, N., & Iutynska, G. (2022). Ways of auxin biosynthesis in microorganisms. *Mikrobiolohichni Zhurnal*. 84(2), 57-72.

<https://dspace.nuft.edu.ua/handle/123456789/41098>

«*Mikrobiolohichni Zhurnal*» включено у перелік наукових фахових видань України за спеціальністю 091-Біологія, категорія А (Наказ Міністерства освіти і науки України № 1471 від 26.11.2020); міжнародна індексація: Scopus, квартиль Q4.

Патенти

9. Пирог, Т.П., Леонова, Н.О., Гаврилкіна*, Д.В., Антонюк, С.І., Герштман, А.Ю. Спосіб одержання комплексного мікробного препарату Патент України на винахід № 121902. 10.08.2020.

10. Пирог, Т.П., Леонова, Н.О., Гаврилкіна*, Д.В., Антонюк, С.І., Палійчук, О.І. Спосіб одержання комплексного мікробного препарату Патент України на винахід № 123216. 03.03.2021.

11. Пирог, Т.П., Леонова, Н.О., Гаврилкіна*, Д.В., Антонюк, С.І., Луцай, Д.А. Спосіб одержання комплексного мікробного препарату Патент України на винахід № 123217. 03.03.2021.

Тези доповідей у матеріалах конференцій

12. Клименко Н.О., П'ятецька Д.В., & Пирог Т.П. (2019). Інтенсифікація синтезу ауксинів штаму *Nocardia vaccinii* IMB В-7405 за умов росту на відпрацьованій олії. *Матеріали Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Науково-інноваційний супровід збалансованого природокористування»*, Рівне, Україна, Жовтень 31, с. 80-82.

13. Пирог Т.П., П'ятецька Д.В., Клименко Н.О., Леонова Н.О., Шевчук, Т.А. (2019) Синтез гіберелінів продуцентами поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* IMB В-7405, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 та *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017. *Програма та тези матеріалів VIII Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції»*, Київ, Україна, Листопад 5-6, с. 31-32.

14. Клименко Н.О., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П., Леонова Н.О., & Шевчук Т.А. (2019) Вплив попередника біосинтезу на утворення ауксинів продуцентом поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoacetus* IMB В-7241. *Збірник наукових праць «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології»*. Випуск 6, Харків, Україна, Листопад 7-8, с. 222-223.

15. Клименко, Н.О., П'ятецька, Д.В., & Пирог, Т.П. (2019) Вплив якості олії на синтез ауксинів продуцентом поверхнево-активних речовин *Nocardia vassinii* IMB В-7405. *Збірник тез VIII Міжнародної науково-практичної онлайн конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії»*, Київ, Україна, Листопад 15, с. 89-91.

16. Клименко Н.О., П'ятецька, Д.В., & Пирог, Т.П. (2019) Вплив попередника на біосинтез ауксинів продуцентом ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-724. *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Майбутній науковець – 2019»*, м. Сєвєродонецьк, Україна, Грудень 12, с. 2-14.

17. Клименко, Н.О., Жданюк, В.І., & П'ятецька, Д.В. (2020). Вплив попередника на синтез ауксинів продуцентом поверхнево-активних речовини *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017. *Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття»*, Київ, Україна, Травень 20, с. 42.

18. Жданюк, В.І., Клименко, Н.О., П'ятецька, Д.В., & Пирог, Т.П. (2020). Інтенсифікація синтезу ауксинів штамом *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017 за умов росту на етанолі. *Збірник тез Міжнародної науково-практичної конференції «Перспективні матеріали та інноваційні технології: біотехнологія, прикладна хімія та екологія»*, Київ, Травень 14-15, с. 51.

19. Клименко, Н., П'ятецька, Д., Пирог, Т., & Леонова, Н. (2020) Інтенсифікація синтезу ауксинів *Nocardia vassinii* IMB В-7405 та їх вплив на врожайність томатів. Матеріали 86 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті», Київ, Україна, Квітень 2-3, с. 386.

20. Клименко Н.О., Жданюк В.І., & П'ятецька Д.В. (2020) Інтенсифікація синтезу фітогормонів ауксинової природи у продуцента поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241. VIII Міжнародна науково-

практична конференція молодих вчених і спеціалістів «Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур», с. Центральне, Україна, Квітень 24, с. 44.

21. Клименко Н.О., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., & Пирог Т.П. (2020). Вплив попередника синтезу ауксинів на активність триптофантрансамінази *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241. *Матеріали VI Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні питання розвитку біології та екології»*, Вінниця, Україна, Жовтень 21-22, с. 56-58.

22. Клименко Н.О., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., & Пирог Т.П. (2020) Вплив триптофану на активність триптофантрансамінази штаму *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії: матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції*, Харків, Україна, Листопад 26, с. 227-228.

23. Клименко Н.О., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., & Пирог Т.П. (2020). Синтез ауксинів продуцентом поверхнево-активних речовин *Nocardia vacsinii* IMB B-7405 на промислових відходах. *Техногенно-екологічна безпека України: стан та перспективи розвитку / ТЕБ-2020: матеріали X Всеукраїнської науково-практичної Інтернет-конференції*, Ірпінь, Україна, Жовтень 20-29, с. 180-183.

24. Пирог Т.П., Леонова Н.О., Клименко Н.О., Жданюк В.І., Шевчук Т.А., & П'ятецька Д.В. (2020). Індукція синтезу ауксинів *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 за наявності триптофану. *Програма та тези матеріалів IX Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції»*, Київ, Україна, Листопад 10-11, с. 23-24.

25. Pirog T.P., Leonova N.O., Klymenko N.O., Zhdanyuk V.I., Piatetska D.V., & Shevchuk T.A. (2020). Influence of tryptophan on auxin-synthesizing ability of

surfactant producer *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241. Матеріали IX Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції», Київ, Україна, Листопад 10-11, с. 19-20.

26. Клименко Н.О., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., & Пирог Т.П. (2020). Вплив попередника на синтез ауксинів продуцентом поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017. Матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції «Перспективи еко-інноваційного розвитку сільськогосподарського виробництва», Полтава, Україна, Листопад 20, с. 124-125.

27. Клименко Н.О., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П. (2020). Вплив попередника синтезу ауксинів на активність триптофантрансамінази *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017. Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Майбутній науковець – 2020», Сєвєродонецьк, Україна, Грудень 4, с. 31-32.

28. П'ятецька Д.В., Жданюк В.І., Пирог Т.П., Леонова Н.О., & Шевчук Т.А. (2021). Синтез стимуляторів росту рослин продуцентами поверхнево-активних речовин за наявності триптофану. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «Роль науково-технічного забезпечення розвитку агропромислового комплексу в сучасних ринкових умовах», Дніпро, Україна, Лютий 25, с. 251-252.

29. Piatetska D., Zhdanyuk V., & Pirog T. (2021). Involvement of exogenous tryptophan in the biosynthesis of auxins by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017. Матеріали 87 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті», Київ, Україна, Квітень 15–16, с. 384.

30. Piatetska D., Zhdanyuk V., & Pirog T. (2021). Activity of tryptophan transaminase of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 under the influence of

tryptophan. *Матеріали XVII міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «МОЛОДЬ І ПОСТУП БІОЛОГІЇ»*, Львів, Україна, Квітень 19-21, с. 78.

31. П'ятецька Д.В., Пирог Т.П., & Шевчук Т.А. (2021). Вплив триптофану на активність ключового ферменту індол-3-піруватного шляху у продуцентів поверхнево-активних речовин. *Матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття» присвяченої 20-річчю Факультету біотехнології і біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського*, Київ, Україна, Квітень 23, с. 74.

32. Пирог Т.П., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Леонова Н.О., & Шевчук Т.А. (2021). Інтенсифікація синтезу гіберелінів *Nocardia vaccinii* IMB В-7405 за наявності еритритолу. *Програма та тези матеріалів X Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції»*, Київ, Україна, Листопад 09-10, с. 65.

33. Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П., Леонова Н.О., & Шевчук Т.А. (2021). Утворення гіберелінів за внесення попередника біосинтезу у середовище культивування *Nocardia vaccinii* IMB В-7405. *Матеріали X Міжнародної науково-технічної конференції «Технічний прогрес у тваринництві та кормовиробництві»*, Київ, Україна, Жовтень 4-23, с. 20.

34. Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П., Леонова Н.О., & Шевчук Т.А. (2021) Утворення ауксинів продуцентами поверхнево-активних речовин за наявності триптофану. *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної онлайн-конференції «Біологічні аспекти оптимізації продукційного процесу культурних рослин»*, Чернігів, Україна, Жовтень 26-27, с. 29.

35. Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П., Леонова Н.О., & Шевчук Т.А. (2021) Екзогенний еритритол як попередник інтенсифікації синтезу

гіберелінів *Nocardia vaccinii* IMB В-7405. *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної онлайн-конференції «Біологічні аспекти оптимізації продукційного процесу культурних рослин»*, Чернігів, Україна, Жовтень 26-27, с. 26.

36. Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П., Леонова Н.О., & Шевчук Т.А. (2021). Вплив ріст стимулювальних екзометаболітів *Nocardia vaccinii* IMB В-7405 на врожайність томатів *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної онлайн-конференції «Біологічні аспекти оптимізації продукційного процесу культурних рослин»*, Чернігів, Україна, Жовтень 26-27, с.139.

* - прізвище Гаврилкіна змінено на П'ятецька.