



# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»

(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

“ 28 ” жовтня 2020 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Клименко Наталії Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Інтенсифікація синтезу фітогормонів у комплексі з поверхнево-активними речовинами *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 для використання у рослинництві

керівник роботи Пирог Тетяна Павлівна, к.б.н., професор

( прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від “27”жовтня2020 року № 874-кв

2. Строк подання здобувачем роботи \_\_\_\_\_

3. Вихідні дані до роботи *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Вступ; Розділ 1. Літературний огляд; Розділ 2. Матеріали та методи дослідження; Розділ 3. Інтенсифікація синтезу ауксинів у комплексі з поверхнево-активними речовинами *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 для викоистання у рослинництві; Висновки; Список використаної літератури; Додатки.

5. Перелік графічного матеріалу

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 3	Леонова Н.О., старший науковий співробітник відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту	09.09.2019	16.03.2020



## РЕФЕРАТ

У роботі досліджували можливість інтенсифікації синтезу ауксинів продуцентом поверхнево-активних речовин (ПАР) *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 за наявності попередника біосинтезу в середовищі культивування, антимікробні щодо фітопатогенних бактерій властивості ПАР, синтезованих за присутності триптофану, активність триптофан трансамінази, а також вплив екзометаболітів (ПАР і фітогормонів) *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на врожайність томатів.

Встановлено, що за наявності попередника біосинтезу в середовищі культивування продуцента ПАР концентрація ауксинів була на кілька порядків вищою, ніж без триптофану. Максимальна концентрація ауксинів (5800 мкг/л) досягалася у разі внесення 300 мг/л триптофану у середовище з відпрацьованою соняшниковою олією. Мінімальні інгібуючі концентрації ПАР, синтезованих у середовищі з триптофаном, щодо збудників бактеріозів томатів були вищими, ніж ПАР, одержаних за відсутності попередника (1,41-5,63 мкг/мл і 5,63-90,0 мкг/мл відповідно).

Встановлено, що внесення триптофану в середовище культивування штаму ІМВ В-7405 супроводжувалося підвищенням активності досліджуваного ферменту. Максимальна активність триптофан трансамінази досягалася за наявності 300 мг/л триптофану: активність цього ферменту становила  $833 \text{ нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  білка, що в 5,3 рази вище, ніж на середовищі без попередника ( $156 \text{ нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  білка). У разі обробки кореневої системи розсади томатів і вегетуючих рослин екзометаболітами *N. vaccinii* ІМВ В-7405 врожайність томатів збільшилася на 80-90%.

Робота складається з вступу, 3 розділів, списку використаної літератури та додатків. Загальний обсяг роботи – 82 сторінки, містить 9 таблиць та 4 рисунки.

*Ключові слова: ауксини, екзометаболіти, комплексний препарат, триптофан трансаміназа, стимуляція росту, антимікробна активність*

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ШЛЯХИ БІОСИНТЕЗУ АУКСИНІВ У МІКРООРГАНІЗМІВ.....	8
1.1. Триптофан-залежний шлях біосинтезу ауксинів .....	9
1.1.1. Індол-3-піруватний (ІП) шлях.....	10
1.1.2. Індол-3-ацетамідний (ІАМ) шлях .....	14
1.1.3. Синтез ІОК через індол-3-ацетонітрил (ІАН) .....	18
1.2. Підходи до інтенсифікації синтезу індол-3-оцтової кислоти.....	24
1.2.1. Збільшення синтезу ауксинів за наявності в середовищі попередника їх біосинтезу.....	24
1.2.2. Вплив інших факторів синтезу ІОК у бактерій.....	32
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	36
2.1. Об'єкти досліджень .....	36
2.2. Умови культивування продуцента поверхнево-активних речовин <i>N. vaccinii</i> ІМВ В-7405.....	36
2.3. Визначення концентрації ауксинів.....	37
2.4. Виділення поверхнево-активних речовин.....	39
2.5. Визначення антимікробної активності ПАР .....	39
2.6. Визначення активності триптофантрансамінази <i>N. vaccinii</i> ІМВ В- 7405 .....	40
2.7. Вегетаційний дослід .....	41
2.8. Статистична обробка експериментальних даних .....	41

РОЗДІЛ 3. ІНТЕНСИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ АУКСИНІВ У КОМПЛЕКСІ З ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИМИ РЕЧОВИНАМИ <i>NOCARDIA VACCINII</i> ІМВ В-7405 ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ У РОСЛИННИЦТВІ .....	42
3.1. Синтез ауксинів <i>N. vaccinii</i> ІМВ В-7405 за наявності в середовищі культивування попередника їх синтезу .....	42
3.2. Антимікробна активність поверхнево-активних речовин <i>N. vaccinii</i> ІМВ В-7405 синтезованих в присутності триптофану .....	47
3.3. Вплив триптофану на активність триптофантрансамінази продуцента поверхнево-активних речовин <i>Nocardia vaccinii</i> ІМВ В-7405.....	50
3.4. Використання комплексного мікробного препарату на основі <i>N.</i> <i>vaccinii</i> ІМВ В-7405 для підвищення врожайності томатів .....	53
3.5. Порівняння базової і вдосконаленої інтегрованої технології отримання комплексного препарату .....	57
ВИСНОВКИ .....	60
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	62
ДОДАТКИ .....	77

## ВСТУП

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 моно препаратами [1].

У попередніх дослідженнях було встановлено здатність продуцента поверхнево-активних речовин (ПАР) *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 синтезувати фітогормони стимулювальної дії – ауксини, цитокініни та гібереліни [2]. Оскільки ПАР штаму *N. vaccinii* ІМВ В-7405 притаманний широкий спектр антиадгезивної та антимікробної активності, у тому числі і щодо фітопатогенних бактерій, то комплексний препарат, що містить ПАР і фітогормони, є перспективним для використання у рослинництві. Разом з тим, концентрація фітогормонів, синтезованих *N. vaccinii* ІМВ В-7405, була невисокою (70-100 мкг/л), що суттєво знижувало ефективність використання препарату з метою стимуляції росту рослин.

У той же час з літератури [3] відомо, що більшість ґрунтових бактерій здатні синтезувати ауксини тільки за присутності в середовищі культивування триптофану – попередника біосинтезу індол-3-оцтової кислоти (ІОК). Оскільки штам *N. vaccinii* ІМВ В-7405 синтезує фітогормони ауксинової природи на широкому спектрі вуглецевих субстратів без внесення триптофану, то існують потенційні можливості для підвищення їх синтезу.

					НУХТ БТЕК 02.02.07		ДР ПЗ			
		№ докум.	Підпис		ВСТУП		Літ.	Арк.	Акрюшів	
Розроб.	Клименко Н.О.								6	2
Перевір.	Пирог Т.П.									
Консультант	Леонова Н.О.									
Н. Контр.										
Затверд.	Пирог Т.П.									
							Кафедра БТМ			

Зазначимо, що ПАР як і фітогормони є вторинними метаболітами склад, і властивості яких залежать від умов культивування продуцента. Тому немає гарантії того, що ПАР, синтезовані за наявності в середовищі культивування триптофану, будуть характеризуватися високою антимікробною активністю.

Раніше нами було показано, що обробка кореневої системи розсади томатів екстрактом фітогормонів і супернатантом культуральної рідини супроводжувалася підвищенням врожайності рослин. Проте в попередніх дослідженнях ми не враховували вплив поверхнево-активних речовин з антимікробною активністю на ріст і розвиток томатів.

У зв'язку з викладеним вище **метою роботи** є дослідити можливість інтенсифікації синтезу ауксинів, антимікробну активність поверхнево-активних речовин, синтезованих за наявності в середовищі культивування триптофану, а також комплексний вплив екзометаболітів *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на ріст і врожайність томатів.

## ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

### РОЗДІЛ 1. ШЛЯХИ БІОСИНТЕЗУ АУКСИНІВ У МІКРООРГАНІЗМІВ

В сучасних умовах все більшого значення набуває використання фітогормональних препаратів в землеробстві, рослинництві та лісовому господарстві. Це пов'язано з перспективами можливості повнішої реалізації генетичного потенціалу культур, підвищення стійкості рослин проти стресових факторів біотичної та абіотичної природи, а також збільшення та покращення якості врожаю [4].

Одним з найбільш поширених і детально вивчених природних гормонів є ауксини. Відомості про наявність в рослинах біологічно-активних речовин з ріст-стимулювальними властивостями з'явилися ще більше ніж сто років тому. Зокрема, в 1924-1928 рр. українським вченим М.Г. Холодним вперше з коріння, стебла та листків рослин було виділено індол-3-оцтову кислоту (ІОК) – перший ауксин, названий пізніше гормоном росту рослин [5].

Крім рослин, утворювати у достатньо високих концентраціях ІОК здатні як асоційовані з рослиною мікроорганізми [11–16, 18, 39, 59, 60], так і фітопатогенні бактерії [20, 24, 26, 27], а також гриби [35–37]. Бактеріальна ІОК стимулює розтягнення клітин в колеоптилях і пагонах рослини, активує ділення клітин камбія, прискорює зав'язування плодів, а також сприяє коренеутворенню, збільшуючи кількість і довжину додаткових і головного кореня.

Проте у деяких випадках здатність до синтезу ІОК є фактором патогенності бактерій і грибів по відношенню до рослин. Оскільки за високих концентрацій ІОК починається неконтрольований ріст рослин з

					НУХТ БТЕК 02.02.07		ДР ПЗ	
		№ докум.	Підпис					
Розроб.		<i>Клименко Н.О.</i>			<b>ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		<i>Пирог Т.П.</i>					8	28
Консультант		<i>Леонова Н.О.</i>				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>						

подальшим пошкодженням покривних тканин, в результаті чого через утворені розриви фітопатогени проникають всередину рослини-хазяїна [6].

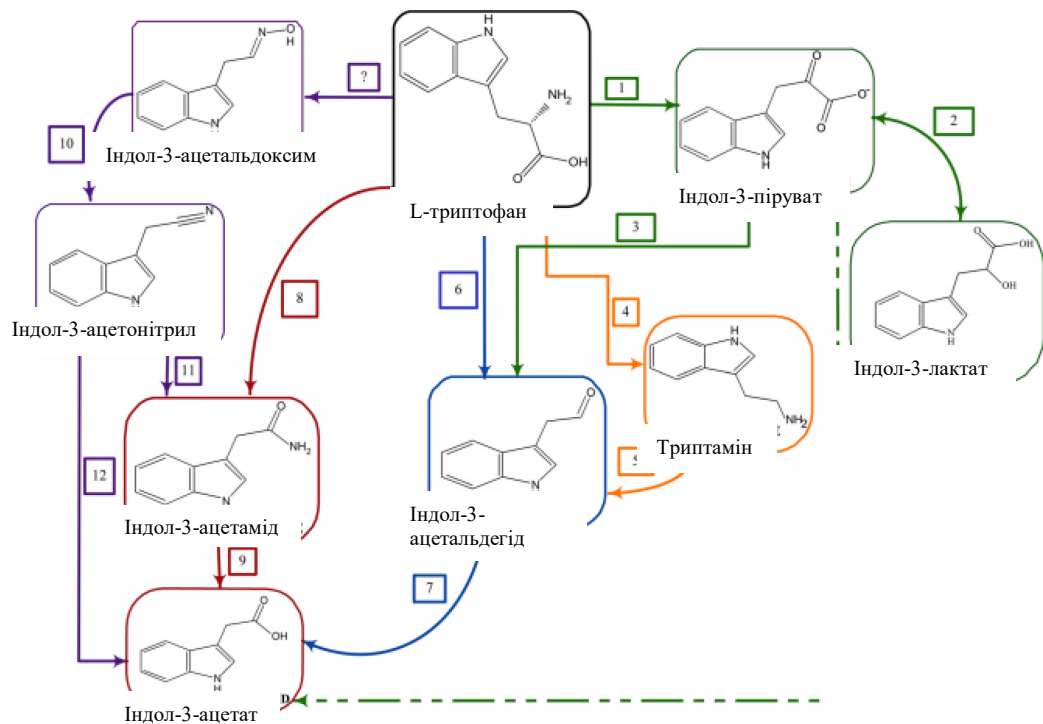
З літератури [7] відомо, що основним попередником синтезу ІОК є гетероциклічна амінокислота – L-триптофан, тому синтез ауксинів може проходити двома шляхами: постадійним перетворенням в ІОК триптофану (триптофан-залежний шлях) або за використання інших інтермедіатів, таких як ацетонітрил (триптофан-незалежний). Зазначимо, що останній шлях синтезу ауксинів є маловивченим і в доступній на сьогоднішній день літературі немає відомостей щодо функціонування даного шляху в мікроорганізмів. Створення препаратів безпосередньо пов'язано з отриманням штамів бактерій з високим ІОК-синтезувальним потенціалом, що можливе тільки при повному розумінні шляхів регуляції і синтезу ауксинів у бактерій.

У зв'язку з наведеним вище метою огляду є узагальнення сучасних літературних даних стосовно шляхів біосинтезу ауксинів різними групами мікроорганізмів.

### **1.1. Триптофан-залежний шлях біосинтезу ауксинів**

Залежно від утворених проміжних продуктів існує три варіанти асиміляції триптофану у мікроорганізмів. Розрізняють індол-3-піруватний (ІП), індол-3-ацетамідний (ІАМ), та індол-3-ацетонітрильний шляхи (ІАН) [6].

Схема триптофан залежного шляху синтезу ІОК у мікроорганізмів наведено на рис.1 [8].



*Рис. 1.* Шляхи синтезу ІОК у бактерій. Зелені, оранжеві та сині лінії – індол-3-піруватний шлях синтезу індол-3-оцтової кислоти, червоні – індол-3-ацетамідний шлях, фіолетові – індол-3-ацетонітрильний. Пунктирними лініями позначено неферментативні реакції.

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

### 1.1.1. Индол-3-піруватний (III) шлях

Індол-3-піруватний шлях – основний шлях синтезу індол-оцтової кислоти, який функціонує як в рослин, так і в бактерій.

На першому етапі L-триптофан дезамінується до індол-3-пірувату під дією ферменту триптофанамінотрансферази (КФ 2.6.1.99), далі індоліл-3-піруватдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.74) – ключовий фермент ІРА-шляху, перетворює індол-3-піруват в індол-3-ацетальдегід, який в свою чергу окиснюється до ІОК під дією індоліл-3-ацетальдегідоксидази (КФ 1.2.3.7) [9, 10].

**Синтез ІОК PGPR-бактеріями.** Найбільшою групою бактерій з високою ауксин-синтезувальною здатністю є PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria – ризобактерії, що стимулюють ріст рослин), адже приблизно 80% представників цієї групи характеризуються відмінними ріст-стимулювальними властивостями. Насамперед це пов'язано з тим, PGPR-бактерії населяють ризосферу рослин і перебувають в тісній взаємодії з рослиною-господарем. Саме тому синтез даною групою бактерій ІОК відіграє важливу роль у відносинах типу «бактерія-рослина» [11].

Imada зі співавт. [11] встановили, що симбіотичний азотфіксуючий штам *Rhizobium tropici* CIAT 899 утворює 33,03 мкг/мл ІОК за присутності в середовищі культивування триптофану. Також автори відзначили інгібуючий вплив іонів амонію на синтез ауксинів у *R. tropici* CIAT 899. Так, в присутності амоній дигідроген фосфату концентрація ІОК становила 11,86 мкг/мл, що в 2,5 рази менше, ніж за внесення в середовище культивування як джерела вуглецю азоту. За внесення в середовище амоній хлориду ІОК не було виявлено.

Вченими з Індії [12] з ризосфери Абрису молитовного (*Abrus precatorius*) було виділено три штами бактерій *Enterobacter* sp.: А27СК, А3СК і А7СК. Максимальної концентрації ІОК (430 мкг/мл) було досягнуто за культивування А7СК на середовищі з 0,5% манітолу і 0,1% L-аспарагіну, що в 2,5 рази більше, ніж за вирощування цього штаму на базовому середовищі (170 мкг/мл) без додаткового внесення манітолу і зазначеної вище незамінної амінокислоти.

В роботі [13] авторами було зазначено, що ендofітний штам *Glucanacetobacter diazotrophicus* PAL5, який колонізує коріння та стебло очерету цукрового, утворює ІОК саме через ІІІ-шлях. За вирощування штаму PAL5 на середовищі з 0,1 г/л триптофану сумарна концентрація індолних сполук становила 117 мг/л (індол-3-оцтова кислота, індол-3-піруват, індол-лактат).

У 2018 р. Estenson зі співавт. присвятили свою роботу [14] дослідженню шляху синтезу індол-3-оцтової кислоти ризосферним штамом *Pantoea* sp. YR343, який був ізольований з прикореневої зони тополі дельтовидної (*Populus deltoides*). Аналіз геному штаму YR343 показав, що в присутності 1 mM триптофану активними були 7 ароматичних аміотрансфераз і 17 альдегід дегідрогеназ, які каталізують реакції перетворення триптофану в ІОК через індол-3-піруват. На жаль, автори не визначали концентрації синтезованих фітогормонів, що не дає можливості оцінити ауксин-синтезувальний потенціал даного штаму.

В роботах [15, 16] вчені досліджували механізми регуляції синтезу індол-3-оцтової кислоти у бактерій.

У своїй роботі [15] Parsons зі співавт. встановили, що внесення в середовище культивування штаму *Enterobacter cloacae* UW5, який був виділений з ризосфери газону, певної групи амінокислот сприяло підвищенню концентрації синтезованої ІОК. Насамперед це пов'язано з тим, що із внесенням таких ароматичних амінокислот як триптофан, тирозин та фенілаланін, активність промотору *ipdC* (кодує індолпіруват декарбоксилазу – ключовий фермент індол-3-піруватного шляху) підвищувалася в 1,8-2,7 рази. Окрім того внесення в середовище культивування таких лінійних амінокислот як аланін, валін, лейцин та ізолейцин спричиняло зниження активності *ipdC* на 30-55%. Концентрацію ІОК вчені не визначали.

У 2018 р. було опубліковано ще одну роботу [16] в якій вченими було описано спосіб регуляції синтезу ІОК внесенням в середовище культивування *Azospirillum brasilense* Sp245, *A. brasilense* Az39 та *A. brasilense* Cd ароматичних та лінійних амінокислот. Також було встановлено, що досліджувані штами Sp245, Az39 та Cd здатні синтезувати ІОК (5,73, 6,09 та 6,27 мкг/мл відповідно) у присутності 0,1 мг/мл триптофану.

Зазначимо, що подібні дослідження необхідні для розуміння унікальних регуляторних механізмів синтезу фітогормонів і можуть стати основою для розробки технології їх промислового одержання.

**Вільноіснуючі мікроорганізми.** На сьогоднішній день найбільш широко застосування отримали методи генетичної модифікації для конструювання організмів з необхідними властивостями. Не винятком є і отримання над продуцентів індол-3-оцтової кислоти.

Guo зі співавт. [17] було створено генетично модифікований штам *Escherichia coli* DG121, який утворював до 387 мг/л ІОК у присутності 0,5 г/л триптофану. Індол-3-піруватний шлях синтезу ІОК було отримано наступним чином: в геном реципієнта було вбудовано амінотрансферазу ARO8 від *Saccharomyces cerevisiae*, яка перетворює L-триптофан в індол-3-піруватну кислоту, декарбоксилазу KDC від *S. cerevisiae* для декарбоксилювання індол-3-пірувату до індол-3-ацетальдегіду, а останнім етапом конструювання було вбудовування в ДНК реципієнта AldH послідовності генів, яка відповідає за окиснення індол-3-ацетальдегіду до індол-3-оцтової кислоти.

Вченими з Тайвані [18] було встановлено, що умовно-патогенний штам *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 утворює до 6,5  $\mu$ M ІОК в присутності 5 mM триптофану. Крім того в культуральній рідині були ідентифіковані й інші сполуки індольної будови: індол-3-лактат та індол-3-етанол, які є інтермедіатами IPA шляху синтезу ІОК. Також вчені встановили, що внесення екзогенної ІОК стимулювало ріст клітин *A. baumannii* в лінійній залежності від кількості внесеної ІОК, а синтез ендогенної ІОК сприяло підвищенню виживання клітин в стресових умовах. Так, за умови внесення в середовище 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> відсоток живих клітин *A. baumannii* ATCC19606 становив 63%, в той час як кількість живих клітин мутантного штаму *A. baumannii ipdC*, нездатного до синтезу ІОК, зменшилася на 33%.

Як зазначалося раніше [19] здатність до синтезу ІОК може бути одним з факторів патогенності у збудників хвороб рослин (фітопатогенні бактерії та гриби).

У своїй роботі [20] McClerkli зі співавт. досліджували шляхи синтезу ІОК фітопатогенним штамом *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Так,

за вирощування DC3000 на середовищі з цитратом штам утворював до 30,6 мкг/л ІОК через індол-3-ацетальдегід, який є інтермедіатом ІРА-шляху.

Отже, з описаних вище робіт можна зробити наступні висновки. По-перше, для переважної більшості ризосферних бактерій характерним є індол-3-піруватний шлях синтезу ІОК. По-друге, існує можливість регуляція синтезу ауксинів на рівні експресії генів, відповідальних за утворення необхідних ферментів.

### 1.1.2. Індол-3-ацетамідний (ІАМ) шлях

Ще одним триптофан-залежним шляхом синтезу індол-3-оцтової кислоти є індол-3-ацетамідний (ІАМ) (див. рис. 2). Цей шлях є менш поширеним, оскільки притаманний деяким симбіотичним мікроорганізмам [21, 22] та переважній більшості фітопатогенів [23, 24, 27, 36], оскільки, крім стимуляції росту рослин, бактеріальна ІОК є одним з факторів їх вірулентності [25]. За високих концентрацій ауксинів рослина зазнає неконтрольованого поділу клітин, що призводить до ракових новоутворень [23].

Як приклад, на рис. 2 наведено схему синтезу ІОК фітопатогенним штамом *Agrobacterium tumefaciens* Ach5 згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [26].

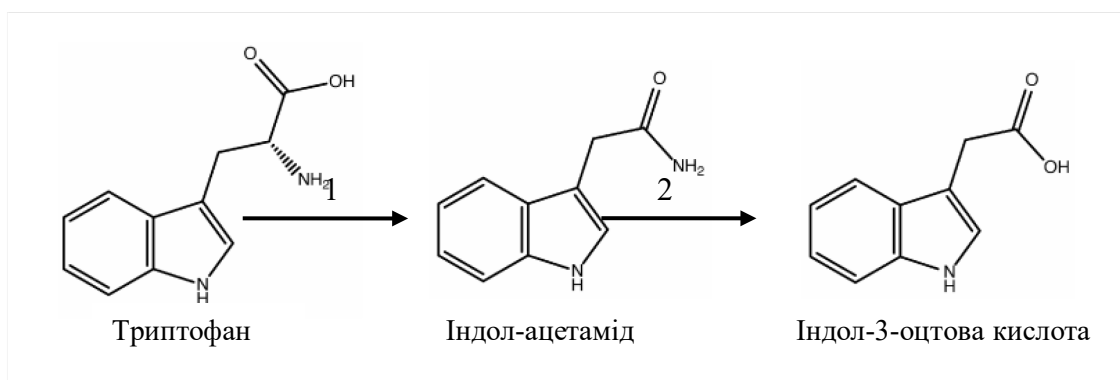


Рис. 2. Синтез індол-3-оцтової кислоти штамом *Agrobacterium tumefaciens* Ach5.

Ферменти: 1 – триптофан-2-монооксигеназа (КФ 1.13.12.3); 2 – індол ацетамід гідролаза (КФ 3.5.-);

Синтезовані *A. tumefaciens* Ach5 ауксини і цитокініни сприяють утворення пухлин та дедиференціювання (втрата спеціалізованості) тканин рослин. Результатом такої взаємодії фітопатогена та рослину-господаря є утворення коронкових галів – карциноми, яка зустрічається переважно у фруктових дерев [27].

**Асоційовані з рослиною мікроорганізми.** В роботі [21] вченими було досліджено здатність азотфіксуючих бактерій *Bradyrhizobium japonicum* E109 і *Bradyrhizobium elkanii* 5019 утворювати індол-3-оцтову кислоту, проте концентрації синтезованої ІОК були вкрай низькими і становили 0,67 і 1515,17 пікомоль/мл відповідно. Відсутність в геномі бактерій генетичної послідовності *ipdC*, яка кодує ключовий фермент індол-3-піруватного шляху, і присутність в культуральній рідині індол-3-ацетаміду (0,3-0,55 пікомоль/мл) засвідчує функціонування ІАМ шляху біосинтезу індол-оцтової кислоти. Додавання екзогенної ІОК в середовищі культивування сприяло підвищенню екзополісахарид (ЕПС)-синтезувальної здатності та накопиченню біомаси досліджуваними штамми. Ймовірно це може бути пов'язано з запуском механізмів стресостійкості у досліджуваних ризобій, оскільки ІОК є гормоном, який утворюється рослинами для боротьби зі стресом (засухою, солоністю, перепадами температур тощо).

У 2008 р. з ризосфери горошку чорного (*Vigna mungo*) було виділено штам *Pseudomonas fluorescence* Psd, який синтезував комплекс антимікробних сполук (антибіотики феназинового ряду, піролінітрин, ліпидепсипептид) за умов росту штаму на середовищі з глюкозою і пептоном [28]. Пізніше [29] цими ж вченими було встановлено здатність штаму *P. fluorescence* Psd, крім антибіотиків, синтезувати і фітогормони, зокрема індол-3-оцтову кислоту. Концентрація ІОК становила приблизно 80 мкг ІОК/ОГ (оптична густина суспензії клітин за довжини хвилі 600 нм) за умови росту штаму Psd на сукцинаті з додаванням 5 mM триптофану.

В подальших своїх дослідженнях [30] Kochar зі співавт. встановили, що штам *P. fluorescence* Psd синтезує ІОК саме через індол-3-ацетамідний шлях. За вирощування штаму Psd на середовищі з сукцинатом концентрація індол-3-оцтової кислоти становила 1,8 мкг/ОГ.

У роботах [22, 31–34] дослідниками було встановлено присутність у геномі мікроорганізмів активних генетичних послідовностей *iaaM* та *iaaH* відповідальних за синтез ключових ферментів ІАМ-шляху – триптофан 2-монооксигенази та амідази відповідно.

У 2019 р. було опубліковано роботу [22] в якій показано, що максимальна концентрація ІОК (6,621 мг/л) досягалася за вирощування ендоефітного штаму *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007, ізольованого з гілок тополі канадської (*Populus × euramericana*) на триптон-соєвому середовищі у присутності 1 г/л триптофану. Зазначимо, що хоч концентрація синтезованої ІОК і досягала кілька мг/л, проте авторам не вдалося досягти необхідного ступеня трансформації триптофану в індол-3-оцтову кислоту, на що вказує її порівняно низький вихід.

У роботі [31] з філосфери ладанного дерева (*Boswellia sacra*) було виділено *Preussia* sp. BSL-10, який утворював 1,64 мкг/мл ІОК за культивування штаму на середовищі з глюкозою і триптоном. Зазначимо, що супутнім метаболітом синтезу ІОК був інший клас фітогормонів – гібереліни, представлені у вигляді гіберелової кислоти (ГК). В супернатанті *Preussia* sp. BSL-10 були виявлені ГК<sub>4</sub>, ГК<sub>7</sub>, ГК<sub>15</sub> та ГК<sub>53</sub> в концентраціях 0,27, 0,4, 1,35 та 4,19 нг/мл відповідно. Обробка розсади рису на стадії «двох-листіків» культуральною рідиною *Preussia* sp. BSL-10 супроводжувалася збільшенням довжини кореня та стебла на 40-119% відносно контролю (обробка рослин супернатантом), що засвідчує позитивний вплив екзометаболітів *Preussia* sp. BSL-10 на ріст рослин.

Велику групу мікроорганізмів, які синтезують ІОК через ІАМ шлях, становлять актиноміцети роду *Streptomyces* [32–35]. В тому числі виділені з парші картоплі штами *Streptomyces violaceus* 44 і *Streptomyces griseus* 20, а

також *Streptomyces scabies* RL 840170 та *Streptomyces exfoliatus* RL 830103 – фітопатогени, які спричиняють коркові ураження на бульбах картоплі (*Solanum tuberosum*) [32].

Lin зі співавт. [33] з ризосфери тису китайського (*Taxus chinensis*) було ізольовано штам *Streptomyces* sp. En1, який утворював ІОК за культивування на триптон-соєвому бульйоні у присутності 5 mM триптофану. На жаль, дослідниками було тільки якісно ідентифіковано наявність ІОК в супернатанті стрептоміцетів, проте кількісний склад

В 2019 р. опубліковано роботу [34] в якій автори дослідили здатність виділеного з ризосфери сої (*Glycine max*) *Streptomyces* sp NEAU-S7GS2 до синтезу ІОК, а також його позитивний вплив на ріст рослин. Так, за передпосівної обробки насіння кукурудзи кукультуральною рідиною штаму NEAU-S7GS2 довжина кореня, а також його суха маса збільшувалася на 55,9% і 151,7% відповідно. Автори зазначають, що отримані результати засвідчують перспективи використання *Streptomyces* sp NEAU-S7GS2 у складі препаратів для рослинництва.

В огляді [35] вченими було підсумовано доступну, з почату ХХ ст. і до 2016 р., інформацію стосовно властивостей метаболітів, синтезованих стрептоміцетами, та їх практичного застосування в сільському господарстві. Зокрема було зазначено, що збудник парші картоплі *Streptomyces scabiei* у присутності 10 mM триптофану утворював у високих концентраціях ІОК (1,1 мг/г СБ). Також було встановлено, що внесення в середовище культивування амінокислоти підвищувало експресію *iaaM* та *iaaH* генів [37].

**Фітопатогенні мікроорганізми.** Синтез ІОК через індол-3-ацетамід зустрічається серед представників родів *Agrobacterium* [27], *Pseudomonas* [24], а також у мікроскопічних грибів роду *Fusarium* [36].

В роботі [24] встановлено, що збудник вузлового захворювання Маслини європейської (*Olea europaea*) *savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 утворює до 5,565 мг ІОК на г сухої біомаси (СБ) за умови культивування на триптоні. Зауважимо, що даний штам є одним з найбільш перспективних

продуцентів ІОК серед всіх описаних вище бактерій, оскільки утворює ІОК у високих концентрація без додаткового внесення в середовище культивування таких попередників синтезу як триптофан або індол-3-ацетамід.

Tsavkelova зі співавт. [36] досліджували синтез ІОК серед представників роду *Fusarium*. Встановлено, що найвища концентрація ІОК (78,7 мкг/мл) досягалася за культивування штаму *Fusarium proliferatum* ET1 на сахарозі в присутності 4 mM триптофану. Також вченими, шляхом перенесення *iaaM* та *iaaH* генів від *F. proliferatum* ET1, було сконструйовано рекомбінантний штам *Fusarium fujikuroi* #2, який синтезував 1459,4 мкг/мл ІОК.

Аналіз літературних даних показав, що ІАМ-шлях синтезу індол-3-оцтової зустрічається серед ризосферних, вільноживучих бактерій, а також фітопатогенних мікроорганізмів. На сьогоднішній день цей шлях біосинтезу ауксинів є добре вивченим про що свідчить достатня кількість робіт присвячених аналізу геному ІОК-синтезуювальних мікроорганізмів, а також спробам регуляції синтезу ІОК та створенню рекомбінантних штамів надсинтетиків.

### **1.1.3. Синтез ІОК через індол-3-ацетонітрил (ІАН)**

Синтез індол-3-оцтової кислоти через індол-3-ацетонітрильний (ІАН) притаманний переважно вищим рослинам, проте невелика кількість повідомлень [38, 39] присвячена біосинтезу ІОК через ІАН мікроорганізмами.

На рис. 3 наведено схему біосинтезу індол-3-оцтової кислоти [40].

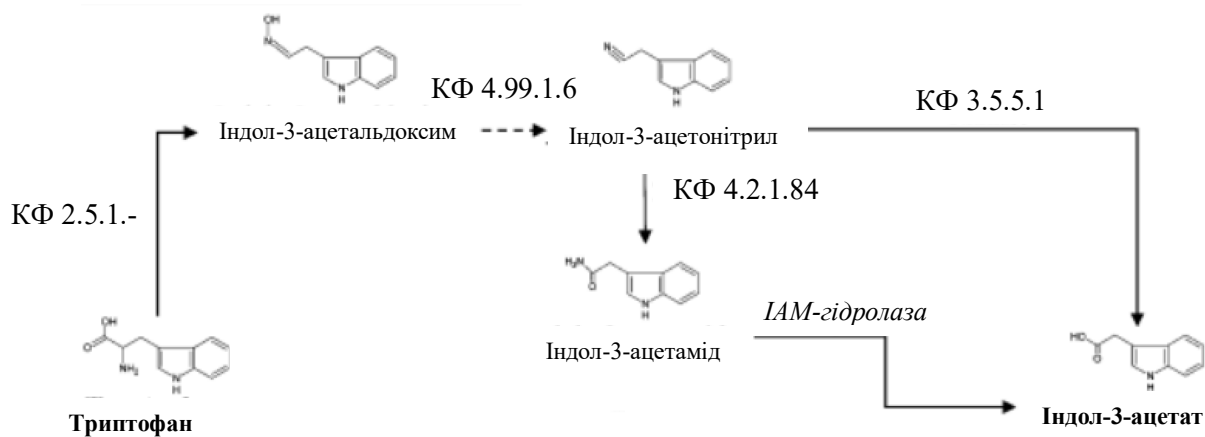


Рис. 3. Біосинтез індол-3-оцтової кислоти через індол-3-ацетонітрил

Під дією N-гідроксил-триптамін оксидоредуктази (КФ 2.5.1.-) триптофан окиснюється до індол-3-ацетальдоксиму, від якого відщеплюється вода внаслідок взаємодії з індолацетальдоксим дегідратазою (КФ 4.99.1.6), утворений індол-3-ацетонітрил під дією нітрилази (КФ 3.5.5.1) перетворюється в індол-3-оцтову кислоту. Крім того, в деяких випадках перетворення індол-3-ацетонітрилу в ІОК відбувається через індол-3-ацетамід (нітрил гідратаза  $\alpha$ -субодиниця – КФ 4.2.1.84).

У 2016 р. з'явилось перше повідомлення [38] про синтез індол-3-оцтової кислоти через ІАН-шлях представниками *Fusarium* spp. Максимальна концентрація ІОК (до 180 мкМ) досягалася за вирощування штаму *Fusarium graminearum* DAOM 233423 на середовищі з глюкозою і сахарозою у присутності 0,1 mM індол-3-ацетонітрилу як попередника синтезу.

В роботі [39] Sun зі співавт. було встановлено, що ризосферний штам *Variovorax boronicumulans* CGMCC 4969 синтезував 1,49 ммоль/л ІОК у присутності 100 мг/л індол-3-ацетонітрилу. Вченими було встановлено, що попередником синтезу ІОК у *V. boronicumulans* CGMCC 4969 є ІАН, а синтез відбувається через індол-3-ацетамід.

На сьогоднішній день зустрічаються лиш поодинокі повідомлення стосовно функціонування ІАН-шляху в мікроорганізмів, що вказує на його маловивченість. Тому подальші дослідження індол-3-ацетонітрильного шляху дозволять краще зрозуміти етапи синтезу і механізмів регуляції ІОК.

Узагальнені дані щодо шляхів синтезу ІОК наведено в табл. 1.1.

## Синтез індол-3-оцтової кислоти різними групами мікроорганізмів

Продуцент	Група мікроорганізмів	Джерело вуглецю	Концентрація триптофану, г/л	Концентрація ІОК, мг/л	Література
<b>Індол-3-піруватний шлях</b>					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Вільно існуючий	Гліцерол	1,0	6,5 мкМ	[18]
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	PGPR	Декстроза	0,1	33,03	[11]
<i>Enterobacter</i> sp. A7CK	PGPR	Манітол L-аспарагін	1,0	430,0	[12]
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5	PGPR	Глюкоза Гліцерол	0,1	117,0 <sup>a</sup>	[13]
<i>Pantoea</i> sp. YR343	PGPR	Глюкоза	0,2	н.в.	[14]
<i>Enterobacter cloacae</i> UW5	PGPR	Пептон	0,2	н.в.	[15]
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	PGPR	Глюкоза Малат	0,1	5,73	[16]
<i>Azospirillum brasilense</i> Az39	PGPR	Глюкоза Малат	0,1	6,09	[16]
<i>Azospirillum brasilense</i> Cd	PGPR	Глюкоза Малат	0,1	6,27	[16]
<i>Escherichia coli</i> DG121	Вільно існуючий	Глюкоза	0,5	387,0	[17]

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	Фітопатоген	Гліцерол	0,05	14,1	[20]
<b>Індол-3-ацетамідний шлях</b>					
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109	PGPR	Манітол	0,01	0,67 ppm/мл	[21]
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> 5019	PGPR	Манітол	0,01	1515,17 ppm/мл	[21]
<i>Pseudomonas fluorescence</i> Psd	PGPR	Сукцинат	1,0	80 мкг ІОК/ОГ <sup>б</sup>	[29]
<i>Pseudomonas fluorescence</i> PsdGI1	PGPR	Сукцинат	1,0	120 мкг ІОК/ОГ <sup>б</sup>	[40]
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> JK-SH007	PGPR	Глюкоза	1,0	6,621	[22]
<i>Preussia</i> sp. BSL-10	Ендофіт	Глюкоза	—	1,64	[31]
<i>Streptomyces</i> sp. En1	PGPR	Триптон	1,0	н.в.	[33]
<i>Streptomyces</i> sp HCI 12	PGPR	Триптон	0,1	н.в.	[34]
<i>Streptomyces</i> sp HCI 36 SVI	PGPR	Триптон	0,1	н.в.	[34]
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> NCPPB 3335	Фітопатоген	Триптон	—	5,565 мг/г СБ <sup>в</sup>	[24]
<i>Fusarium proliferatum</i> ET1	Фітопатоген	Сахароза	0,8	78,7	[36]

<i>Fusarium fujikuroi</i> #2	Фітопатоген	Сахароза	0,8	1,4594	[36]
<b>Індол-3-ацетонітрильний шлях</b>					
<i>Fusarium graminearum</i> DAOM 233423	Фітопатоген	Глюкоза Сахароза	—	180 μМ	[38]
<i>Variovorax boronicumulans</i> CGMCC 4969	PGPR	Триптон	—	1,49 ммоль/л	[39]

**Примітка.** <sup>a</sup> – сумарна концентрація індольних сполук; <sup>б</sup> – оптична густина (ОГ); <sup>в</sup> – суха біомаса (СБ); н.в. – концентрацію ІОК не визначали; — – триптофан не вносили;

## **1.2. Підходи до інтенсифікації синтезу індол-3-оцтової кислоти**

З кінця 90-х рр. ХХ століття інтерес до мікробних фітогормонів зріс і саме з цього моменту почалося активне їх дослідження. Проте лиш упродовж останніх 10-ти років вченим вдалося врегулювати синтез фітогормонів, зокрема індол-оцтової кислоти, змінюючи умови культивування, джерело вуглецю або додаючи до середовища попередник синтезу – триптофан.

На сьогоднішній день відомо два варіанти впливу на синтез ІОК у мікроорганізмів – прямий та опосередковий. У першому випадку підвищення концентрації синтезованих ауксинів відбувається за рахунок внесення попередника синтезу ІОК в середовище культивування мікроорганізму [20, 30, 41–56]. У другому – внаслідок впливу стресових факторів, біотичного чи абіотичного походження, на ІОК-синтезувальну здатність бактерій. Зазначимо, що останній спосіб інтенсифікації синтезу можливий в асоційованих з рослиною ризобактерій [59, 60, 57, 58].

### **1.2.1. Збільшення синтезу ауксинів за наявності в середовищі попередника їх біосинтезу**

Одна з перших робіт щодо підвищення синтезу ауксинів при внесенні попередника біосинтезу у середовище культивування було опубліковано бельгійськими вченими Costacurta та Vanderleyden у 1995 р. [41]. Проте питання інтенсифікації фітогормонів і донині залишається актуальним, тому зацентруємо увагу на публікаціях останніх років.

Упродовж 2013-2019 рр. з'явилася інформація про синтез ауксинів як асоційованими [42, 46–49], так і не асоційованими [20, 52] з рослинами бактеріями.

### **Інтенсифікація синтезу ІОК у асоційованих з рослинами бактерій**

Бактерії, які існують в асоціативних зв'язках з рослинами проживають в її ризосфері – зоні ґрунту, яка оточує корінь, або філосфері – наземних частинах рослин (листя, стебло), заселеній мікроорганізмами [41].

Синтезовані цими мікроорганізмами фітогормони функціонально рівноцінні до гормонів, які синтезує і сама рослина, чим і був зумовлений інтерес вчених з усього світу до продуцентів ІОК.

**Ризосферні мікроорганізми.** Найбільша кількість публікацій [42–44, 46–50] присвячена ризосферним бактеріям, які синтезують фітогормони, зокрема індол-3-оцтову кислоту.

З ризосфери коренів банану вченими було виділено ендofітний штам *Stenotrophomonas maltophilia* BE25 [42], який синтезував у порівняно високих концентраціях ІОК як за відсутності в середовищі триптофану (38,85 мкг/л), так і при внесенні його в кількості 0,1% від об'єму середовища (39,72 мкг/л). Невелика різниця (<1 мкг/л) між показниками синтезу ІОК в присутності і відсутності попередника біосинтезу вказують на наявність триптофан-незалежного шляху біосинтезу ауксину штамом BE25.

Wagi і Ahmed [42] встановили, що виділений з ризосфери пасльону чорного (*Solanum nigrum*) штам *Bacillus cereus* So3II b на середовищі без триптофану утворював 23,3 мг/л ІОК, а при додаванні попередника у 3 рази більше – 70,0 мг/л. Концентрацію триптофану, що забезпечувала синтез такої кількості ауксинів, автори не наводили, проте у дослідженнях використовували попередник у достатньо високій кількості (5–40 мг/мл). Зазначимо, що на відміну від штаму *S. fradiae* NKZ-259 [18], *B. cereus* So3II характеризувався значно вищим рівнем синтезу ІОК навіть за умов росту на середовищі без попередника.

Вченими з Таїланду [44] з ризосфери орхідеї (*Dendrobium pulchellum*) було виділено неідентифікований штам під номером DPY-05, який утворював ІОК в концентрації 67,18 мг/л (в присутності 0,5 г/л триптофану), що майже в 9 разів вище, ніж без внесення попередника біосинтезу (11,48 мг/л).

У роботі [45] зазначено, що концентрація ІОК, синтезованої *Bacillus subtilis* DR2, підвищувалася майже в 1,7 рази (168,1 мг/л) у присутності 1,2 мг/л триптофану і з використанням як джерела вуглецю – манітолу.

Naveed зі співавт. [50] встановили, що концентрація ІОК, синтезованої *Burkholderia phytofirmans* PsJN, підвищувалася з 0,84 мкг/мл до 11,78 мкг/мл за внесення в середовище культивування 1%-го розчину триптофану.

З забрудненої важкими металами ризосфери рослин було виділено штам *Bacillus* sp. JH 2-2 [51], який у присутності 0,5 мг/мл триптофану утворює 6,44 мкг/мл ІОК, в той час як за відсутності даної амінокислоти в середовищі культивування штаму JH 2-2 ауксини не було виявлено.

В наступних роботах [46–48] авторами не було наведено даних щодо синтезу ІОК ризосферними мікроорганізмами за відсутності триптофану. Тому ми не можемо стверджувати, що дослідниками було інтенсифіковано синтез даного ауксину.

Так, зокрема Jeyanthi і Ganesh [46] встановили, що при внесенні в середовище культивування *Pseudomonas fluorescence* sp 0,5 г/л триптофану концентрація ауксинів досягла свого максимуму в стаціонарній фазі росту – 58 мг/л. Також було зазначено, що збільшення концентрації попередника біосинтезу до 0,6 г/л зменшувало концентрацію ауксинів більше ніж в 2 рази. На думку авторів це могло бути пов'язано з використанням триптофану для енергетичних потреб клітини, а не як попередника синтезу ІОК.

Автори роботи [47] зазначали, що штам *Enterobacter cloacae* SN19 у присутності 0,1% триптофану синтезував ІОК в концентрації 382,23 мкг/л. Також було відмічено, що за відсутності в середовищі культивування триптофану ІОК не синтезувалася.

Ozidal зі співавт. [48] з ризосфери *Verbascum vulcanicum* було виділено штам *Arthrobacter agilis* A17, який синтезував ІОК у кількості 78 мг/л в присутності 1 г/л в середовищі культивування екзогенного триптофану. Також цими дослідниками було іммобілізовано клітини *A. agilis* A17 в шарі альгінату, що дозволило підвищити концентрацію ІОК до 520 мг/л шляхом повторного використання клітин *A. agilis* A17 (до 13 разів).

Kochar зі співавт. [30] встановили, що концентрація ІОК збільшувалася з 1,8 мкг/ОГ до 25,8 мкг/ОГ за культивування *P. fluorescence* Psd у

присутності 5 mM триптофану. Крім того вченим вдалося підвищити синтез ІОК у 5 разів (з 25 до 120 мкг/ОГ) створивши штам *P. fluorescence* PsdGI1 з надекспресією генів *iaaM/iaaH*, відповідальних за синтез ключових ферментів ІАМ шляху. На жаль, в даній роботі концентрацію ІОК було представлено в мкг/ОГ, що не дає можливості порівняти отримані результати з іншими, для продуцентів індол-оцтової кислоти.

**Філософерні бактерії.** Штам *Enterobacter* sp. DMKU-RP206, який був ізольований з листя рису [49] синтезує, на середовищі з лактозою і 1,1 % триптофану, до 5,56 г/л ІОК, що в 13,4 рази більш, ніж без триптофану (0,415 г/л).

### **Інтенсифікація синтезу ІОК неасоційованими з рослинами мікроорганізмами**

Здатність до синтезу фітогормонів також була встановлена серед вільноживучих бактерій, які не беруть безпосередньої участі в життєдіяльності рослин [20, 52].

В роботі [20] дослідники зазначали, що збудник бактеріальної плямистості рослин *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 синтезує до 2,76 мкг/л ІОК за присутності 0,25 mM триптофану в середовищі культивування. Зокрема внесення в середовище культивування 0,25 mM індол-3-пірувату замість триптофану сприяло підвищенню концентрації ІОК до 14,1 мкг/л.

Так, Мон Муо із співавт. [52] встановили, що продуцент неоміцину *Streptomyces fradiae* NKZ-259 на середовищі без триптофану синтезував 4,876 мкг/л індол-3-оцтової кислоти, а в разі його внесення (2 г/л) рівень синтезу збільшився у 20 разів (до 82,363 мкг/л). Проте ефективність трансформації такої кількості триптофану в ІОК штамом NKZ-259 була вкрай низькою.

На нашу думку, враховуючи спосіб існування та концентрації ІОК, синтез даного класу фітогормонів у описаних вище мікроорганізмів [20, 52] може бути одним з механізмів захисту бактерій за несприятливих умов навколишнього середовища. Оскільки в іншій роботі [18] дослідниками було

зазначено, що присутність екзогенної ІОК сприяла росту клітин, а наявність ендогенної ІОК – їх виживанню в стресових умовах.

### Вплив триптофану на синтез ІОК в еукаріотів

Найбільш вивченими є шляхи синтезу ІОК у бактерій і невелика кількість робіт присвячена дослідженню утворення фітогормонів у грибів та дріжджів [53–56].

В роботі [53] автори зазначали, що штам дріжджів *Rhodospodium paludigenum* DMKURP301 утворював до 1,33 г/л індол-оцтової кислоти за умови додаванням 5 г/л триптофану. В той час як за відсутності в середовищі культивування попередника ІОК не було виявлено.

Fu із співавт. опублікували роботу [54] в якій зазначали, що дев'ять виділених з філосфери росички штамів *Aureobasidium pullulans*, синтезували 9-611 мг/л ІОК в присутності 1 г/л триптофану. Отримані показники були майже в три рази більше, ніж без внесення в середовище культивування попередника біосинтезу ІОК (1,6-236 мг/л).

Штам *Rhodospiridiobolus fluvialis* DMCU-CP293 [55] на середовищі з глюкозою в присутності 1 г/л триптофану синтезував до 1062 мг/л ІОК, в той час як за відсутності в середовища культивування попередника ауксинів не було виявлено.

Swetha і Padmavathi у праці [56] зазначали, що максимальна концентрація ІОК становила 7,39 г/л при культивування штаму *Piriformospora indica* на середовищі з додаванням 0,2 г триптофану, що в 6,5 раз вище, ніж без попередника біосинтезу. Штам вирощували на середовищі при рН 8,0 (оптимальне рН синтезу близько 7).

Узагальнені дані щодо інтенсифікації синтезу ІОК у мікроорганізмів наведено в табл. 1.2.

З таблиці 1.2 видно, що найвищі концентрації ІОК (5,56 г/л і 7,39 г/л) було отримано *Enterobacter* sp. DMKU-RP206 і *Piriformospora indica* відповідно при внесенні триптофану в середовище культивування у

невисоких концентраціях. Отримані результати синтезу ІОК дають змогу розглядати зазначені вище мікроорганізмами як перспективні продуценти ауксинів для розробки відповідної технології.

## Вплив триптофану на синтез індол-3-оцтової кислоти (ІОК)

Мікроорганізм-продуцент	Джерело вуглецю	Вміст триптофану в середовищі культивування, г/л	Концентрація ІОК		Література
			До інтенсифікації	Після інтенсифікації	
<b>Асоційовані з рослинами мікроорганізми</b>					
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> BE-25	Декстроза	1,0	38,85 мкг/л	39,72 мкг/л	[42]
<i>Bacillus cereus</i> So3II b	Глюкоза	Не зазначали	23,3 мг/л	70,0 мг/л	[43]
Неідентифіковані штами	Манітол	0,5	0,21-2,5 мг/л	16,22 мг/л	[44]
<i>Bacillus subtilis</i> DR2	Манітол	0,0012	100,3 мг/л	168,1 мг/л	[45]
<i>Enterobacter</i> sp. DMKU-RP206	Лактоза	11,0	0,415 г/л	<b>5,56 г/л</b>	[49]
<i>Pseudomonas fluorescense</i> Psd	Сукцинат	1,0	1,8 мкг/ОГ	25,8 мкг/ОГ	[30]
<i>Bacillus</i> sp. JH 2-2	Сахароза	0,5	0 мкг/мл	6,44 мг/л	[51]
<b>Вільноіснуючі мікроорганізми</b>					
<i>Streptomyces fradiae</i> NKZ-259	Крохмаль	2,0	4,876 мкг/л	82,363 мкг/л	[52]
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	Цитрат	0,05	0,03 мкг/л	2,76 мкг/л	[20]
<b>Еукаріоти</b>					
Штами <i>Aureobasidium pullulans</i>	Пептон Декстроза	1,0	1,6-236 мг/л	9-611 мг/л	[54]

Закінчення табл. 1.2

<i>Rhodosporidiobolus fluvialis</i> DMCU-CP293	Глюкоза	1,0	0	1,062 г/л	[55]
<i>Rhodosporidium</i> <i>paludigenum</i> DMKURP301	Сахароза	5,0	0	1,33 г/л	[53]
<i>Piriformospora indica</i>	Декстроза	0,2	1,12 г/л	<b>7,39 г/л</b>	[56]

**Примітка.** н.в. – не визначали;

### 1.2.2. Вплив інших факторів синтез ІОК у бактерій

Абіотичні та біотичні фактори стресу, так само як і рослинні сигнальні молекули, які пов'язані з реакцією рослин на несприятливі умови, здатні впливати на ріст асоційованих з рослиною бактерій, а також на їх здатність до синтезу ІОК [59]. Насамперед це пов'язано з тим, що однією з функцій ІОК є її вплив на ріст та диференціацію кореня, підвищення його проникності для поживних речовин та води, а також участь у формуванні стійкості до несприятливих умов, що є важливим фактором в умовах засухи, осмотичного і теплового шоку [61].

До рослинних сигнальних молекул відносять абсцизову, саліцилову та жасмонову кислоти, які синтезуються рослинами у відповідь переважно на абіотичні фактори стресу (засуха, солоність, висока температура і присутність важких металів) [62, 63]. Серед медіаторів біотичного стресу велику групу складає білок NPR1 (non expressor of pathogenesis-related genes1), який у невеликих кількостях утворюється в інфікованих фітопатогенами тканинах рослин і запускає механізм синтезу PR (pathogenesis-related) білків (хітиназ, глюканаз та інгібіторів протеаз) [63].

З літератури відомо, що для деяких ризосферних бактерій підвищений синтез ауксинів спостерігається за несприятливих умов навколишнього середовища (зміна рН, температури, висока солоність), а також у присутності антагоністів ІОК – саліцилової і жасмонової кислот [59, 60, 57, 58].

В роботі [57] авторами було встановлено вплив зміни рН на синтез ІОК у PGPR-штамів (CA1001, CA2003 та CA2004), виділених з ризосфери стевії медової. Концентрація синтезованої ІОК підвищувалася з 65 мг/л до 91,7 мг/л при зміні рН середовища культивування з 7 до 9 відповідно.

Hasuty зі співавт. [58] було встановлено, що штам *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* KB05 синтезує максимальну концентрацію ІОК (56,6 мг/л) в умовах стресу (рН 9,0, t=40°C). Отримані в ході дослідження показники

були в 8 рази вищі, ніж за умов вирощування даного штаму при рН 7,0 за температури  $t=30^{\circ}\text{C}$  ( $\approx 7$  мг/л).

В роботі [59] вчені досліджували вплив абіотичних (солоність, висока температура  $45^{\circ}\text{C}$ , наявність в середовищі культивування антимікробної сполуки хітозану і абсцизової кислоти антагоніста синтезу ауксинів) та біотичних факторів (супернатант фітопатогенних мікроорганізмів *Pseudomonas savastanoi* та *Fusarium oxysporum*, різні концентрації саліцилової кислоти та метил жасминової кислоти) на синтез ІОК штамми *Azospirillum brasilense* Sp245 (pFAJ64) та *A. brasilense* Az39 (pFAJ64). Встановлено, що в присутності 0,1 mM абсцизової кислоти концентрація ІОК підвищувалася на 12,1% і 11,2% відповідно, а рівень експресії гену *ipdC* був на 10,7% і 17,2% більше, ніж в контрольному варіанті (184-185 одиниць Міллера). Найкращі показники синтезу спостерігалися за внесення в середовище культивування штамів Sp245 (pFAJ64) та Az39 (pFAJ64) супернатанту *F. oxysporum* (4% від об'єму) і хітозану (0,01%) – концентрація ІОК підвищувалася в 1,2 і 1,3 рази відносно контролю (4,7 мкг/мл).

В умовах абіотичного стресу (низького вмісту азоту в середовищі культивування) концентрація ІОК, синтезованої *Serratia* sp.Z, виділеної з ризосфери тополі євфратської (*Populus euphratica*), підвищувалася і становила 35 мкг/мл. За відсутності факторів стресу, коли концентрація азоту підвищилася з 4 до 10 мкг/мл, покращувалося накопичення біомаси, проте концентрація ауксинів була низькою. На жаль автори не зазначали початкову концентрацію ІОК за нормальних умов [60].

Узагальнені дані щодо впливу умов культивування на синтез ІОК у бактерій наведено в табл. 1.3.

Таким чином авторами було встановлено, що підвищення температури і/або рН дозволяє підвищити концентрацію ІОК. Проте варто зазначити, що даний спосіб підвищення синтезу ауксинів не дозволяє отримати високі вихідні концентрації ІОК і підбирається експериментально для кожного окремого штаму.

## Підвищення синтезу ауксинів в умовах стресу

Мікроорганізм-продуцент	Джерело вуглецю	Умови культивування	Концентрація ІОК, мг/л		Література
			До інтенсифікації	Після інтенсифікації	
Неідентифіковані штами	Пептон	pH 9,0	65	91,7	[57]
<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> KB05	Триптон	pH 9,0, t=40°C	7	56,6	[58]
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 (pFAJ64)	Малат	0,01% хітозану	4,7	6,36	[59]
<i>Azospirillum brasilense</i> Az39 (pFAJ64)	Малат	0,01% хітозану	4,86	6,20	[59]
<i>Serratia</i> sp.Z	Глюкоза	0 mM CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	–	35,0	[60]

**Примітки.** – не вказували;

Аналіз літературних даних показав, що до синтезу ІОК здатні різні групи мікроорганізмів. Найбільша кількість робіт присвячена дослідженням біосинтезу індол-3-оцтової кислоти асоційованими з рослинами бактеріями.

Зазначимо, що з розумінням шляхів синтезу цільового продукту перед дослідниками відкриваються нові перспективи і підходи для інтенсифікації синтезу ІОК. По-перше, використання як попередника синтезу не тільки триптофану, а й інших інтермедіатів функціонуючого у даного мікроорганізму шляху (індол-3-піруват – ІПА-шлях, індол-3-ацетамід – ІМА-шлях, індол-3-ацетонітрил – ІАН-шлях). По-друге, знання генетичних послідовностей, відповідальних за синтез ключових ферментів, дозволить підвищити експресію необхідних генів [15, 16] і створити рекомбінантні штами надсинтетиків ІОК [17, 36]. Крім того існує і третій підхід підвищення синтезу ІОК – вплив факторів стресу на PGPR-бактерії. Проте даний спосіб інтенсифікації синтезу має ряд недоліків у порівнянні з іншими: низька ефективність, індивідуальний підхід для кожного штаму та складність технологічної організації великомасштабних виробництв.

На теперішній час найбільш визнаним і поширеним способом підвищення синтезу ІОК є внесення в середовище культивування попередника синтезу. Одним з перспективних продуцентів ІОК, який використовує триптофан як попередник синтезу, є *Enterobacter* sp. DMKU-PP206 [49]. Даний штам синтезує до 5,56 г/л, в той час як інші ІОК-синтезувальні мікроорганізми утворюють цей фітогормон в концентрації від кількох мкг/л до 1 г/л.

Враховуючи сучасні можливості біотехнології та генетичної інженерії можна сподіватися, що у найближчому майбутньому дослідниками буде врегульовано синтез ІОК у мікроорганізмів та створено продуцентів індол-3-оцтової кислоти, що в свою чергу сприятиме реалізації мікробного синтезу ауксинів промислових масштабів.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Об'єкти досліджень

Основним об'єктом досліджень був, виділений із забруднених нафтою зразків ґрунту, штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Nocardia vaccinii* К-8 і зареєстрований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України під номером ІМВ В-7405 [64].

Крім того, як тест-культури для визначення антимікробної активності поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* ІМВ В-7405 використовували фітопатогенні бактерії *Agrobacterium tumefaciens* 8628, *Pseudomonas syringae* 8511, *Xanthomonas vesicatoria* 9098, *Pectobacterium carotovorum* 8982, *Clavibacter michiganensis* 102 і *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 140R, які люб'язно були надані працівниками відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного.

#### 2.2. Умови культивування продуцента поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* ІМВ В-7405

Штам *N. vaccinii* ІМВ В-7405 вирощували у середовищі, що містило (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 0,5–1,25;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001; дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка). Джерело вуглецю та енергії – рафінована, а також відпрацьована після смаження картоплі «фрі» соняшникова олія в концентрації 1 % (об'ємна частка).

Триптофан вносили у середовище у вигляді 1 %-го розчину у кількостях 100, 200 або 300 мг/л на початку процесу або в кінці

					НУХТ БТЕК 02.02.07		ДР ПЗ			
		№ докум.	Підпис							
Розроб.		Клименко Н.О.			ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА		Літ.	Арк.	Акрушів	
Перевір.		Пирог Т.П.							36	6
Консультант		Леонова Н.О.					Кафедра БТМ			
Н. Контр.										
Затверд.		Пирог Т.П.								

експоненційної фази росту (на 48 год культивування).

Як інокулят використовували культури в експоненційній фазі росту, вирощені на відповідних рідких середовищах, що містили 0,5–1 % (об'ємна частка) субстрату. Кількість посівного матеріалу ( $10^4$ – $10^5$  кл/мл) становила 5–10 % від об'єму поживного середовища. Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 28–30 °С упродовж 168 год.

Дослідження проводили у декілька етапів: встановлення якісного і кількісного складу фітогормонального комплексу; визначення антимікробної активності поверхнево-активних речовин в умовах інтенсифікації синтезу ауксинів, дослідження впливу триптофану на активність триптофантрансамінази *N. vaccinii* ІМВ В-7405; визначення впливу комплексу екзометаболітів штаму ІМВ В-405 на врожайність упродовж вегетації.

### **2.3. Визначення концентрації ауксинів**

Ауксини визначали у супернатанті, для отримання якого культуральну рідину центрифугували (5000 g) упродовж 25 хв. Залишки соняшникової олії з культуральної рідини видаляли шляхом її трикратної екстракції петролейним ефіром або гексаном (співвідношення 1:1).

Позаклітинні фітогормони ауксини виділяли методом перерозподілу фітогормонів у двох фазах розчинників, що не змішуються між собою [65]. Як органічний розчинник використовували етилацетат, рН 3,0. Одержані екстракти випарювали під вакуумом при 40-45°C. Сухий залишок перерозчиняли у 80%-ному етанолі, переносили у мікропробірки. Отримані екстракти зберігали за температури –24°C.

Попереднє очищення і концентрування фітогормональних екстрактів (накопичувальна тонкошарова хроматографія) проводили на пластинках із силікагелем марки «Silufol UV<sub>254</sub>» (*Chemapol*, Чехія) у суміші розчинників,

що вводили послідовно: хлороформ, 12,5 % водний аміак, етилацетат : оцтова кислота (20:1).

Якісний і кількісний склад ауксинів аналізували методом високоефективної рідинної хроматографії (high performance liquid chromatography – HPLC), з використанням рідинного хроматографа Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) та мас-спектрометричного (mass spectrometry – MS) детектора Agilent G1956B. HPLC/MS аналіз ауксинових екстрактів *N. vaccinii* ІМВ В-7405 виконано у Центрі колективного користування при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Для порівняння використовували стандартні синтетичні фітогормони *Sigma* (Німеччина) і *Acros Organic* (Бельгія):

IAA – Indole-3-acetic acid, Індол-3-оцтова кислота (ІОК);

ICal – Indole-3-carboxaldehyde, Індол-3-карбоксальдегід;

IC – Indole-3-carbinol, Індол-3-карбінол;

ICA – Indole-3-carboxylic acid, Індол-3-карбоксилова кислота;

IAA-hydr. – Indole-3-acetic acid hydrazide, Індол-3-оцтової кислоти гідразид;

IBut – Indole-3-butyric acid, Індол-3-масляна кислота;

В якості рухомої фази використовували метанол (А) та 1% розчин оцтової кислоти в воді (В). Розділення проводили на хроматографічній колонці Zorbax SB-C18 (2,1мм×150мм, 3 мкм) (Agilent Technologies, USA), швидкість потоку через колонку 0,25 мл/хв, температура термостату 30 °С, об'єм інжекції 2 мкл. Елюювання проводили в градієнтному режимі: 0 хв – А (30 %) : В (70 %); 25 хв – А(30 %) : В (70 %); 35 хв – А (100 %) : В (0 %); 35 хв – А (100 %) : В (0 %).

Детекцію сполук проводили з використанням діодно-матричного детектора з реєстрацією сигналу при 254 та 280 нм та фіксацією спектрів поглинання в діапазоні 191-700 нм. Для визначення молекулярних мас досліджуваних сполук використовували мас-спектрометричний детектор

Agilent G1956B (Agilent Technologies, USA). Іонізацію проводили в режимі ESI та APCI з фіксацією позитивних іонів в режимі SCAN в діапазоні 100-1200 m/z. Калібрування проводили з використанням стандартних розчинів ауксинів.

#### **2.4. Виділення поверхнево-активних речовин**

Супернатант отримували як було описано вище. Для екстракції ПАР у циліндричну ділильну воронку об'ємом 100 мл вносили 25 мл супернатанту і 25 мл суміші Фолча (хлороформ і метанол 2:1), струшували (для екстракції ліпідів) упродовж 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишали у воронці для розділення фаз, після чого нижню фракцію збирали (органічний екстракт 1), а водну фазу піддавали повторній екстракції як описано вище і отримували органічний екстракт 2. Аналогічно здійснювали третій етап екстракції, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1–3 упарювали на роторній випарній установці IP-1M2 при температурі 50°C і абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси.

Після екстракції концентрацію позаклітинних ПАР (г/л) визначали ваговим методом.

#### **2.5. Визначення антимікробної активності ПАР**

Антимікробну активність ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 визначали за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) і здійснювали методом двократних серійних розведень у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) для бактерій як описано у роботі [66].

В стерильних умовах у 10 пробірок вносили по 1 мл середовища, у першу додавали 1 мл розчину ПАР певної концентрації, після чого перемішували, відбирали 1 мл і переносили у наступну пробірку. Аналогічно проводили розведення для наступних дев'яти пробірок. З останньої пробірки відбирали 1 мл. Таким чином, кінцевий об'єм у кожній пробірці становив 1 мл (МПБ і розчин ПАР), а концентрація ПАР у кожній наступній пробірці

знижувалася у 2 рази. Як контроль використовували 1 мл МПБ (для бактерій) без додавання розчину ПАР.

Далі у кожному з пробірок вносили по 0,1 мл суспензії однодобових тест-культур ( $10^5$ – $10^6$  КУО/мл) та перемішували. Пробірки інкубували впродовж 24 год при 28–30 °С.

Результати оцінювали візуально за помутнінням середовища: (+) – пробірки, в яких спостерігали помутніння середовища (ріст тест-культури), (–) – помутніння не було (ріст відсутній). Мінімальну інгібуючу концентрацію розчину ПАР визначали як середнє значення між концентраціями ПАР в останній пробірці, де ріст був відсутній, і в попередній, де він був наявний [66].

## **2.6. Визначення активності триптофантрансамінази *N. vaccinii* ІМВ В-7405**

Дослідження активності ферменту проводили у два етапи: отримання безклітинних екстрактів та визначення активності триптофантрансамінази.

### *Одержання безклітинних екстрактів*

Для отримання безклітинних екстрактів культуральну рідину, після вирощування досліджуваних штамів, центрифугували (4000 g) упродовж 15 хв при 4°С.

Осаджені клітини двічі відмивали від залишків поживного середовища 0,05 М  $K^+$ -фосфатним буфером (рН 7,0) центрифугуючи (4000 g, 15 хв, 4°С). Відмиті клітини повторно суспендували в 0,05 М  $K^+$ -фосфатному буфері (рН 7,0) і руйнували ультразвуком (22 кГц) тричі по 60 с при 4°С на апараті УЗДН-1. Зруйновані клітини центрифугували (12000 g) упродовж 30 хв при 4°С. Осад відкидали, а надосадову рідину використовували як безклітинний екстракт.

### *Визначення активності триптофантрансамінази*

Активність триптофантрансамінази (КФ 2.6.1.27, інші назви: L-фенілаланін-2-оксоглутарат амінотрансфераза; триптофан амінотрансфераза;

5-гідрокситриптофан-кетоглутарова трансаміназа; гідрокситриптофан аміотрансфераза; L-триптофан трансаміназа) визначали за утворенням з L-триптофану і 2-оксолутарату індол-3-пірувати, який визначали спектрофотометрично [67].

## **2.7. Вегетаційний дослід**

Вегетаційні досліді проводили на вегетаційному майданчику Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України упродовж трьох місяців з використання як тест-культури томатів сорту Салатний.

Перед посадкою у ґрунт кореневу систему томатів упродовж двох годин витримували у воді (контроль) і розведених у 200 і 400 разів супернатанті і культуральній рідині. Дані розведення були обрані на основі попередніх досліджень для досягнення оптимальної концентрації фітогормонів.

Через місяць частина рослин, окрім контролю (передпосівна обробка кореневої системи водою), була оброблена розчином ПАР з концентрацією 20 мкг/мл для захисту рослин від бактеріозів.

По закінченню вегетаційного періоду в кожному варіанті обробки аналізували кількість і масу плодів.

## **2.8. Статистична обробка експериментальних даних**

Всі досліді проводили в 3 повторностях, кількість паралельних визначень в експериментах становило від 3 до 5. Статистичну обробку експериментальних даних проводили, як описано раніше [2]. Відмінності середніх показників вважали достовірними при рівні значущості  $p < 0.05$ .

**РОЗДІЛ 3. ІНТЕНСИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ АУКСИНІВ У  
КОМПЛЕКСІ З ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИМИ РЕЧОВИНАМИ  
*NOCARDIA VACCINII* ІМВ В-7405 ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ У  
РОСЛИННИЦТВІ**

**3.1. Синтез ауксинів *N. vaccinii* ІМВ В-7405 за наявності в  
середовищі культивування попередника їх синтезу**

Попередні дослідження показали, що синтез метаболітів ауксинової природи залежав від природи джерела вуглецю в середовищі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 [2].

Вибір субстратів (рафінована та відпрацьована після смаження картоплі соняшникова олії) для вирощування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 з метою інтенсифікації синтезу ауксинів був зумовлений наступними причинами. По-перше, за умов росту на рафінованій олії штам *N. vaccinii* ІМВ В-7405 синтезував найвищу кількість ауксинів (770,4 мкг/л) порівняно з іншими субстратами. [2]. По-друге, комплексний мікробний препарат повинен характеризуватися високою антимікробною активністю щодо фітопатогенних бактерій, а раніше [68] було встановлено, що такі властивості притаманні поверхнево-активним речовинам, синтезованим у процесі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на рафінованій та відпрацьованій після смаження картоплі олії. По-третє, відпрацьована олія є токсичним відходом, викиди якої в Україні не регламентуються, а використання її як субстрату дасть змогу одночасно утилізувати небезпечні відходи та знизити собівартість цільового продукту для рослинництва.

Дані, наведені у табл. 3.1 і 3.2, засвідчують, що незалежно від моменту внесення триптофану у середовище культивування штаму ІМВ В-7405 як з рафінованою, так і відпрацьованою олією спостерігали суттєве підвищення

					НУХТ БТЕК 02.02.07		ДР ПЗ		
		№ докум.	Підпис		<b>РОЗДІЛ 3</b>		Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Клименко Н.О.							42	17
Перевір.	Пирог Т.П.						Кафедра БТМ		
Консультант	Леонова Н.О.								
Н. Контр.									
Затверд.	Пирог Т.П.								

синтезу ауксинів порівняно з показниками на середовищі без цього попередника. Серед ауксинів були виявлені індол-3-оцтова кислота, індол-3-карбонова кислота, індол-3-карбоксальдегід, індол-3-оцтової кислоти гідразид, проте найбільший вміст становила ІОК, попередником якої є триптофан. Зазначимо, що найвища концентрація ауксинів досягалася за внесення у середовище з обома субстратами 300 мг/л триптофану.

Відомо [69], що більшість попередників залучаються до процесів біосинтезу вторинних метаболітів в кінці експоненційної або на початку стаціонарної фаз росту. Це чітко прослідковувалося за умов вирощування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на рафінованій олії: внесення 100, 200 і 300 мг/л триптофану в кінці експоненційної фази росту супроводжувалося підвищенням концентрації синтезованих ауксинів в 1,8, 17,8 та 41,3 рази відповідно (див. табл. 3.1).

Таблиця 3.1

**Синтез ауксинів за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 у середовищі з рафінованою олією із внесенням триптофану**

Кількість триптофану, мг/л	Фаза росту	Концентрація ауксинів, мкг/л				Сума ауксинів, мкг/л
		ІОК	ІКК	ІК	ІОК-гідрази д	
0	Лаг-фаза	64,87	6,33	2,13	3,59	76,92
100	Лаг-фаза	28,99	11,59	17,68	–	58,27
	Кінець експоненційної фази	40,57	14,40	84,89	–	139,86
200	Лаг-фаза	348,64	71,73	11,26	–	431,63
	Кінець експоненційної фази	854,03	501,45	–	–	1355,48
	Лаг-фаза	331,42	89,95	–	–	421,37
300	Кінець експоненційної фази	1986,7	1157,0	–	–	3143,70
	Лаг-фаза	331,42	89,95	–	–	421,37

**Примітка.** ІОК – індол-3-оцтова кислота; ІКК – індол-3-карбонова кислота; ІК – індол-3-карбоксальдегід; ІОК-гідразид – індол-3-оцтової кислоти гідразид. «—» – не виявлено.

У той же час інші закономірності спостерігали під час культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 у середовищі з відпрацьованою олією: для більшості варіантів найвищу концентрацію ауксинів спостерігали у разі додавання триптофану на початку процесу культивування (див. табл. 3.2). Ми припускаємо, що це може бути зумовлено якістю використовуваної як субстрату відпрацьованої олії, зокрема, наявністю у її складі компонентів, які можуть так чи інакше впливати на біосинтез фітогормонів. Виясненню даних питань будуть присвячені наші подальші дослідження.

Разом з тим зазначимо, що з точки зору організації технологічного виробництва внесення попередника на початку процесу є значно зручнішим.

Таблиця 3.2

**Вплив триптофану на синтез ауксинів у процесі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на відпрацьованій олії**

Кількість триптофану, мг/л	Фаза росту	Концентрація ауксинів, мкг/л				Сума ауксинів, мкг/л
		ІОК	ІКК	ІК	ІОК-гідразид	
0	Лаг-фаза	4,53	1,81	—	6,89	13,23
100	Лаг-фаза	1258,87	472,58	—	—	1731,45
	Кінець експоненційної фази	874,31	292,10	—	—	1185,67
200	Лаг-фаза	2331,15	470,62	—	—	2801,77
	Кінець експоненційної фази	2166,39	725,81	12,69	—	2910,84
300	Лаг-фаза	4666,74	1139,24	—	—	5805,98
	Кінець експоненційної фази	1538,84	719,73	—	—	2258,57

**Примітка.** ІОК – індол-3-оцтова кислота; ІКК – індол-3-карбонова кислота; ІК – індол-3-карбоксальдегід; ІОК-гідразид – індол-3-оцтової кислоти гідразид. «←» – не виявлено.

Дані, наведені у табл. 3.1 і 3.2, засвідчують, що концентрація синтезованих ауксинів підвищувалася із збільшенням концентрації попередника у середовищі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405. Не виключено, що й подальше підвищення кількості триптофану буде супроводжуватися інтенсифікацією синтезу ауксинів. Проте на даному етапі для створення ефективного мікробного препарату з ріст-стимулювальними властивостями в цьому немає необхідності, оскільки за досягнутої концентрації ауксинів (3000–5000 мкг/л, див. табл. 3.1 і 3.2) культуральну рідину *N. vaccinii* ІМВ В-7405 з метою обробки насіння або кореневої системи розсади рослин необхідно розбавляти як мінімум у 400–500 разів.

Зазначимо, що в огляді [3] було проаналізовано наявну на той час літературу щодо синтезу фітогормонів різними мікроорганізмами. В описаних у огляді роботах дослідники порівнювали синтез ауксинів за відсутності та наявності попередника.

Так, Мон Муо із співавт. [70] встановили, що продуцент неоміцину *Streptomyces fradiae* NKZ-259 на середовищі без триптофану синтезував 4,876 мкг/л індол-3-оцтової кислоти, а у разі внесення триптофану (2 г/л) рівень синтезу збільшився у 20 разів (до 82,363 мкг/л). Проте ефективність трансформації такої кількості триптофану (у 6-10 разів вища, ніж використовується в нашій роботі) в ІОК штамом NKZ-259 була вкрай низькою, а концентрація індол-3-оцтової кислоти перебувала на рівні синтезованої *N. vaccinii* ІМВ В-7405 у середовищі без попередника.

Wagi і Ahmed [71] встановили, що виділений з ризосфери пасльону чорного (*Solanum nigrum*) штам *Bacillus cereus* So3II b на середовищі без триптофану утворював 23,3 мг/л ІОК, а при додаванні попередника у 3 рази більше – 70,0 мг/л. Концентрацію триптофану, що забезпечувала синтез такої

кількості ауксинів, автори не наводили, проте у дослідженнях використовували попередник у достатньо високій кількості (5–40 мг/мл). Зазначимо, що на відміну від штаму *S. fradiae* NKZ-259 [70], *B. cereus* So3II характеризувався значно вищим рівнем синтезу ІОК навіть за умов росту на середовищі без попередника.

Літературні дані свідчать про те, що для ризосферних бактерій, асоційованих з рослинами, підвищений синтез ауксинів часто спостерігається у стресових умовах (зміна рН, температури тощо). Так, автори роботи [72] показали, що за умов культивування виділених з ризосфери стевії медової (*Stevia rebaudiana*) неідентифікованих штамів при рН 9 та температурі 37 °С на середовищі з пептоном (містить у своєму складі триптофан) рівень синтезу ауксинів сягав 91,7 мг/л. У подальших дослідженнях було встановлено, що під час вирощування цих штамів на декстрозі без внесення триптофану концентрація ауксинів досягала 104,0 мг/л.

У 2017 р. з'явилося повідомлення [73] про виділення з філосфери рису штаму *Enterobacter* sp. DMKU-RP206, який на середовищі з лактозою і 1,1 % триптофану синтезував до 5,56 г/л ІОК, що в 13,4 рази більш, ніж без триптофану (0,415 г/л). Така концентрація дає змогу розглядати штам DMKU-RP206 як перспективний продуцент ауксину для розробки відповідної технології. Зазначимо, що в літературі є лише поодинокі публікації про штами, здатні до синтезу такої концентрації ІОК (кілька г/л).

Загалом, аналіз літературних даних показав, що авторам робіт [70–73] вдалося підвищити синтез ІОК у 3–20 разів, щоправда за наявності досить високих концентрацій триптофану (від 1 до 40 г/л). Зазначимо, що за такої концентрації триптофан можна вважати ростовим субстратом, а не попередником біосинтезу. Крім того, використання такої кількості триптофану як компонента поживного середовища є недоцільним з економічної точки зору. Наші дослідження показали, що за значно нижчих концентрацій триптофану (до 300 мг/л) відбувається інтенсифікація синтезу ауксинів у сотні разів.

Крім того, нами вперше показано можливість інтенсифікації синтезу ауксинів на відходах інших виробництв, зокрема, харчової промисловості (відпрацьована після смаження картоплі олія). У літературі подібні відомості відсутні. Щоправда, у 2018 р. було опубліковано роботу [74], в якій встановлено, що ендofітний штам *Pseudomonas aeruginosa* L10 за умов росту на дизельному паливі (5 г/л) без триптофану синтезував 27 мкг/л індол-3-оцтової кислоти, а також утворював поверхнево-активні рамноліпіди. Зазначимо, що у даній роботі автори не намагалися підвищити синтез ІОК.

Таким чином нами було встановлено можливість підвищення кількості синтезованих ауксинів на кілька порядків при внесенні в середовище культивування штаму *N. vaccinii* IMB B-7405 у невисоких концентрацій попередника їх біосинтезу.

### **3.2. Антимікробна активність поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* IMB B-7405 синтезованих в присутності триптофану**

З літератури відомо, що критерієм антимікробної дії препаратів є мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) – найменша концентрація препарату, що спричиняє повне інгібування помітного неозброєним оком росту тест-культури [75]. Визначення МІК дає можливість одночасно порівняти між собою ефективність різних антимікробних агентів, а також препаратів різного ступеня очищення.

Оскільки попередні вегетаційні дослідження проводили на помідорах, тому як тест-культури були обрані найпоширеніші збудники бактеріозів томатів, а також поширені в Україні поліфаги.

Результати дослідження антимікробної активності ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 наведено у табл. 3.3.

**Мінімальна інгібуюча концентрація поверхнево-активних речовин  
*N. vaccinii* ІМВ В-7405 щодо фітопатогенних бактерій**

Тест-культура	Вміст триптофану в середовищі культивування, мкг/л	МІК, мкг/мл
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 8628	0	5,63
	300	1,41
<i>Pseudomonas syringae</i> 8511	0	5,63
	300	1,41
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> 9098	0	1,41
	300	22,5
<i>Pectobacterium carotovorum</i> 8982	0	5,63
	300	1,41
<i>Clavibacter michiganensis</i> 102	0	90,0
	300	2,81
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> 140R	0	90,0
	300	90,0

**Примітка.** Антимікробну активність ПАР досліджували за умови вирощування штаму ІМВ В-7405 на середовищі з відпрацьованою олією; при визначенні МІК похибка не перевищувала 5%.

Внесення триптофану у середовище культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 супроводжувалося синтезом поверхнево-активних речовин, які проявляли вищу антимікробну активність щодо більшості досліджуваних фітопатогенних бактерій, ніж ПАР, синтезовані на середовищі без попередника (1,41-2,81 мкг/мл і 5,63-90,0 мкг/мл відповідно).

Наявні в літературі дані [76–90] стосуються активності мікробних ПАР переважно щодо фітопатогенних грибів і є лише поодинокі відомості про антимікробну активність ПАР по відношенню щодо збудників бактеріозів рослин.

Abdallah зі співавт. було опубліковано кілька робіт [91–93] присвячених дослідженню антимікробної активності ліпептидів *Bacillus* spp. стосовно збудника корончастих галлів *Agrobacterium tumefaciens*. На

жаль, в своїх ранніх працях [91, 92] дослідники визначали антимікробну активність ліпопептидів штамів *Bacillus* spp. за діаметром зони пригнічення росту фітопатогенних бактерій.

Однак в роботі [93] дослідниками було встановлено, що МІК ліпопептидів *Bacillus subtilis* 32а щодо фітопатогенних бактерій *Agrobacterium tumefaciens* C58, *A. tumefaciens* B6, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas savastanoi* перебували в межах від 2 мкг/мл до 156 мкг/мл.

Khanh зі співавт. в праці [94] зазначали, що мінімальна інгібуюча концентрація пельгипептинів (PGPs), синтезованих *Paenibacillus elgii* JCK-5075 коливається від 3,13 мкг/мл до 100,00 мкг/мл стосовно 14 видів збудників захворювань рослин. Найбільш чутливими (МІК 3,13-6,25 мкг/мл) до синтезованого ліпопептиду виявилися *A. tumefaciens*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* та *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Більш стійкими до дії PGPs виявилися *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* та *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (25,00 мкг/мл і 100 мкг/мл відповідно).

В роботі [95] дослідники встановили, що МІК пельгипептинів *Paenibacillus elgii* JCK1400 щодо збудників грибкових захворювань у рослин *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia homoeocarpa*, *Colletotrichum coccodes* перебували в межах 6,25-25,0 мкг/мл. Варто зазначити, що пельгипептинам, описаним в роботах [94, 95], властива висока антимікробна активність по відношенню до фітопатогенних грибів і бактерій. На думку дослідників це зумовлено складом утвореного ліпопептидного комплексу – пельгипептин-А, -В, -С і -D.

Ліу зі співавт. [96] встановили, що синтезованим *Bacillus velezensis* HС6 ліпопептидам притаманна низька антиагоністична активність. МІК антимікробних сполук HС6 щодо *Listeria monocytogenes* 110753, *Micrococcus flavus* NCIB 8166 та *Bacillus cereus* 11846 становить 500 мкг/мл, в той час як для пригнічення фітопатогенних грибів концентрація ліпопептидів має бути в 1,5-2,0 рази вище (800-1000 мкг/мл).

В 2020 р. вченими з Китаю було описано ще одного представника роду *Bacillus* – *Bacillus velezensis* FJAT-46737 [97], який синтезує суміш ліпопептидів з високою антимікробною активністю відносно збудників захворювань рослин. Мінімальна інгібуюча концентрація ліпопептидів FJAT-46737 щодо *Ralstonia solanacearum* FJAT-91 становила 500 мкг/мл. Фунгіцидні властивості синтезованих ліпопептидів вчені досліджували за діаметром зони пригнічення росту наступних тест-мікроорганізмів – *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsicum* FJAT-831, *F. oxysporum* f. sp. *niveum* FJAT-30265 та *F. oxysporum* f. sp. *melonis* FJAT-9230.

Сао зі співавт. [98] зазначали, що МІК ліпопептидів, синтезованих штамами *Bacillus velezensis* Y6 та *B. velezensis* F7, щодо *R. solanacearum* становили 100 і 500 мкг/мл відповідно. Також вченими було встановлено, що антимікробна активність комплексу ліпопептидів штамів Y6 та F7 підвищувалася за рахунок синергізму різних ліпопептидів, синтезованих цими двома штамами, і становила 75 мкг/мл. Зокрема МІК гліколіпідів *B. amyloliquefaciens* Ar10 по відношенню до збудників бактеріозів рослин *Pectobacterium carotovorum* П16, *P. amylovorum*, *P. aeruginosa* АТСС 27853 перебували в межах від 1 до 50 мкг/мл [99].

Одержані нами результати засвідчують, що антимікробна активність ПАР, синтезованих *N. vaccinii* ІМВ В-7405, є навіть вищою у порівнянні з найактивнішими антимікробними агентами – ліпопептидами, описаними вище, що вказує на перспективи подальшого дослідження та практичного використання ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 у боротьбі з бактеріозами томатів.

### **3.3. Вплив триптофану на активність триптофантрансамінази продуцента поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405**

З літератури [100] відомо, що мікроорганізми можуть утворювати ІОК кількома способами:

1. Утворення ІОК через індол-3-ацетамід. Виявлений у фітопатогенних бактерій та грибів;

2. Перетворення триптофану в індол-3-ацетальдегід може включати альтернативний шлях синтезу при якому утворюється триптамін. Цей шлях зустрічається переважно в мікоризних грибів та ціанобактерій.

3. Синтез ІОК через індол-3-піруват та індол-3-оцтовий альдегід вважається основним способом перетворення триптофану в ауксини, який функціонує в бактерій та грибів.

Шляхи утворення ІОК у мікроорганізмів графічно представлено на рис. 3.1 [101].

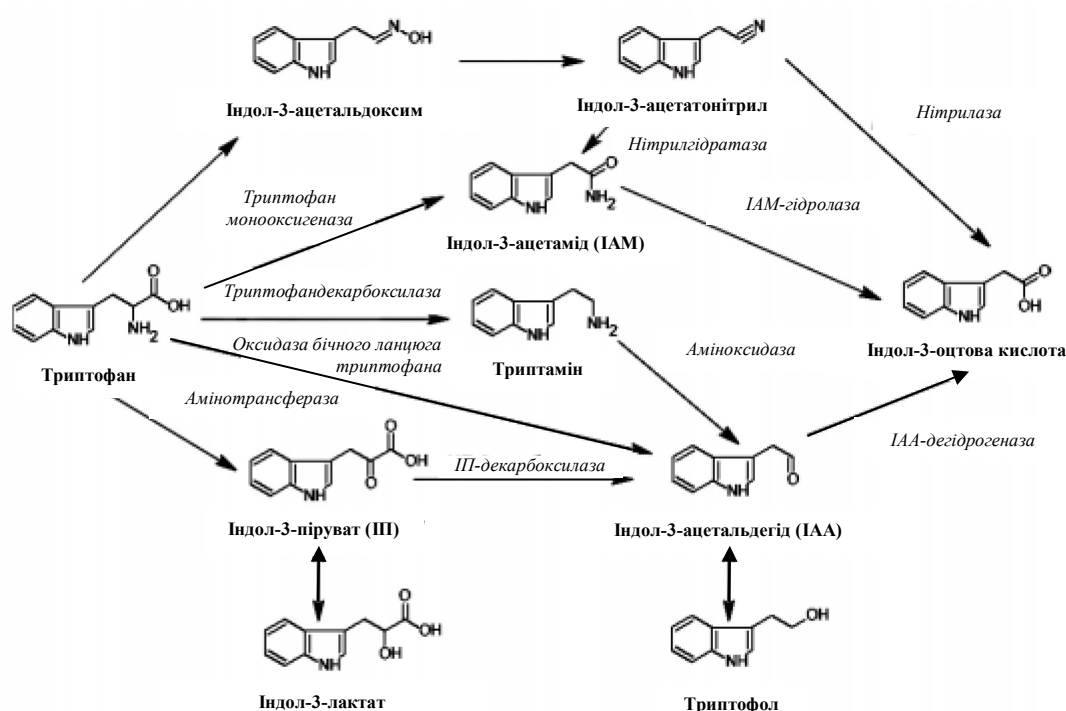


Рис. 3.1. Шляхи синтезу ІОК у бактерій

Оскільки попередніх дослідженнях нами було показано, що присутність в середовищі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 триптофану зумовлювала підвищення концентрація синтезованих ауксинів на кілька порядків, тому нами було припущено, що штам *N. vaccinii* ІМВ В-7405 утворює ІОК через індол-3-піруват, який утворюється з триптофану та 2-оксоглутарату під дією триптофанамінотрансферази. Активність ферменту визначали за внесення 300 мг/л триптофану в середовище культивування досліджуваного штаму.

Внесення попередника синтезу ІОК в середовище культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 супроводжувалося підвищенням активності триптофантрансамінази (див. табл. 3.4).

Таблиця 3.4

**Активність триптофантрансамінази *N. vaccinii* ІМВ В-7405 в присутності триптофану на середовищі з рафінованою олією**

Кількість триптофану, мг/л	Фаза росту	Активність ферменту (нмоль·хв <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> білка)
0	–	156
300	Лаг-фаза	<b>833</b>
0	–	64
300	Кінець експоненційної фази	<b>348</b>

З таблиці 3.4 видно, що незалежно від моменту внесення в середовище культивування штаму ІМВ В-7405 триптофану (на початку культивування чи в кінці експоненційної фази росту) активність досліджуваного ферменту збільшувалася приблизно в 5 разів. Однак, в роботі [102] було зазначено, що за внесення 300 мг/л триптофану в кінці експоненційної фази росту в середовище культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 з рафінованою олією досягалася максимальна концентрація ауксинів 3143,70 мкг/л, в той час як внесення такої ж кількості попередника ІОК на початку культивування супроводжувалося збільшенням кількості фітогормонів ауксинової природи лиш до 421,37 мкг/л.

Отримані дані дають змогу припустити, що у штаму ІМВ В-7405 паралельно з індол-3-піруватним шляхом можуть функціонувати й інші альтернативні способи синтезу ауксинів. Виясненню даних питань будуть присвячені наші подальші дослідження.

### 3.4. Використання комплексного мікробного препарату на основі *N. vaccinii* ІМВ В-7405 для підвищення врожайності томатів

На заключному етапі роботи досліджували вплив екзометаболітів *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на ріст та врожайність томатів.

З літератури [3] відомо, що фітогормони проявляють найвищу ріст-стимулюючу активність в концентраціях  $10^{-5}$ - $10^{-12}$  моль/л. Тому в своїх дослідженнях культуральну рідину і супернатант ми розводили у 200 і 400 разів, тобто до ефективної концентрації фітогормонів.

Через місяць рослини обробляли розчинами мікробних ПАР, розведеними до ефективної, щодо збудників бактеріозів томатів, концентрації (20 мкг/мл).

Дані щодо врожайності томатів наведено в табл. 3.5.

Таблиця 3.5

**Вплив екзометаболітів штаму *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на врожайність томатів**

<b>Варіант обробки кореневої системи рослин</b>	<b>Загальна вага, % щодо контролю</b>	<b>Середня вага плоду, % щодо контролю</b>
Супернатант культуральної рідини (1:200)	+146,6	+106,4
Супернатант культуральної рідини (1:400)	+191,4	+117,6
Культуральна рідина (1:200)	+128,3	+102,5
Культуральна рідина (1:400)	+182,1	+111,9

**Примітка.** Контроль (100%) – обробка кореневої системи розсади водою; контрольні варіанти не обробляли розчинами ПАР;

Одержані дані засвідчують, що за всіх варіантів обробки рослин екзометаболітами *N. vaccinii* ІМВ В-7405 спостерігали підвищення показників врожайності. Найбільший приріст як загальної ваги томатів, так і

середньої ваги плоду (80-90% і 11-17% відповідно) спостерігалось у разі використання культуральної рідини і супернатанту в розведенні 1:400. У разі зменшення ступеня розведення культуральної рідини і супернатанту показники врожайності дещо знижувалися. Отримані дані можна пояснити, що при розведенні 1:400 досягалася оптимальна концентрація фітогормонів у робочому розчині.

Зазначимо, що показники врожайності томатів за обробки супернатантом і культуральною рідиною були практично однакові (191,4% і 182,1% відповідно), тому використання культуральної рідини у рослинництві є доцільнішим з економічної точки зору, оскільки дає змогу виключити з технологічного процесу стадію відділення біомаси.

Фітогормони, зокрема ауксини, відіграють одну з ключових ролей в життєдіяльності рослин, підвищуючи їх врожайність та стресостійкість до біотичних (ураження фітопатогенами) та абіотичних факторів (засуха, засоленість та забруднення металами ґрунтів тощо). Тому на сьогоднішній день в літературі є достатня кількість повідомлень стосовно

В роботах [103–106, 108–110] вчені досліджували вплив ріст-стимулюючих екзометаболітів на ріст (довжина кореня і пагона) та врожайність томатів.

Goudjal зі співавт. [103] зазначали, що обробка насіння томатів супернатантом *Streptomyces* sp. PT2 з концентрацією ІОК 50 мкг/мл, супроводжувалася суттєвим підвищенням енергії проростання насіння та довжиною кореня. Так, через 24 год після обробки супернатантом штаму PT2 відсоток пророщеного насіння становив 86%, а довжини кореня – 33 мм, що в 1,43 та 1,6 рази більше, ніж за замочування насіння в дистильованій воді (контроль). В іншій своїй роботі [104] вченими було зазначено, що довжина коренів і стебла томатів збільшувалася в 1,4 і 1,2 рази відносно контролю через 14 днів після обробки насіння супернатантом *Streptomyces* sp. CA-2.

В роботі [105] встановили, що обробка саджанців томатів розчином ІОК з концентрацією 10  $\mu$ M сприяла розвитку додаткових бічних коренів.

Також позитивний вплив ауксинів на рослини було описано в роботі [106]. Так, за витримування кореневої системи саджанців шпинату, салату та томатів в культуральній рідині штамів *Pseudomonas* S2 та *Pseudomonas* S4 супроводжувалося збільшенням сухої маси пагона на 48-74% у всіх досліджуваних варіантах. Найкращі показники приросту сухої маси, на 74% більше порівняно з контролем, було відзначено за обробки томатів сорту «Ніагус» культуральною рідиною штаму S2.

В 2017 р. Passari зі співав. [107] з ендосфери (кореня, стебла та листя) *Rhynchotoechum ellipticum* було виділено 169 штамів актинобактерій. Серед виділених мікроорганізмів було відначено чотири штами – *Streptomyces olivaceus* BPSAC77, *Streptomyces* sp. BPSAC121, *Streptomyces* sp. BPSAC101 та *Streptomyces thermocarboxydus* BPSAC147, які утворювали від 39,4 мкг/мл до 47,8 мкг/мл індол-3-оцтової кислоти, а також комплекс антимікробних речовин, який складався з антибіотиків (флуконазол, хлорамфенікол, еритроміцин, кетоконазол, рифампіцин та міконазол), фенольних сполук (катехін, кемпферол, чебулагінової кислоти тощо), а також паклітакселу – протиракової сполуки.

В пізнішій своїй роботі [108] Passari зі співав. продовжили дослідження PGPR-властивостей штаму *S. thermocarboxydus* BPSAC147, а також його вплив на ріст та стійкість томатів до грибкових захворювань. Вченими було встановлено, що витримування насіння томатів в культуральній рідині штаму BPSAC147 сприяло пробудженню всього обробленого матеріалу, індекс проростання становив 100%. Прикорнева обробка томатів суспензією *S. thermocarboxydus* BPSAC147 після висадки пророщеного насіння в ґрунт супроводжувалася збільшенням довжини пагона на 6% і довжини кореня на 43,5% порівняно з контролем (110,85 см і 25,9 см відповідно). Крім того, найвищі сухі маси стебла та кореня було отримано за прикореневої обробки рослин – 4,44 г і 1,5 г відповідно, порівняно з цими ж показниками у необроблених рослин (3,49 г та 1,03 г).

Сао зі співав. [109] встановили, що виділений з ризосфери хворих томатів штам *Streptomyces* sp. DHV3-2 утворює комплекс метаболітів, які позитивно впливають на ріст молодих рослин. Так, за прикорневої обробки томатів суспензією міцелію штаму DHV3-2 збільшувалася висота та вага пагона рослин на 15-20% відносно контролю. Окрім того після обробки суспензією міцелію *Streptomyces* sp. DHV3-2 кількість уражених рослин зменшувалася приблизно на 30%, що засвідчує високу антагоністичну активність сполук, синтезованих DHV3-2. Проте варто зазначити, що в даній роботі вчені досліджували тільки вплив екзометаболітів DHV3-2 на томати, що не дає змоги оцінити кількісний і якісний склад синтезованого комплексу.

Дослідниками з Лабораторії молекулярної мікробіології та систематики [110] з ризосфери томату (*Solanum lycopersicum*) було виділено ендofітний штам *Streptomyces* sp. DBT20, який утворював 46,3 мкг/мл ІОК за присутності в середовищі культивування триптофану. Окрім того DBT20 проявляв високу антагоністичну дію (пригнічував розвиток фітопатогенів на 37-67%) щодо наступних збудників захворювань рослин: *Fusarium graminearum*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus* та *Colletotrichum capsici*. Прикорнева обробка томатів та перцю чилі (*Capsicum annuum*) суспензією міцелію штаму DBT20 підвищувала довжину кореня та пагона на 12-33% відносно контролю.

Варто зазначити, що штам DBT20 є більш перспективним, ніж описані вище BPSAC147 та DHV3-2, оскільки має сильніше виражені PGPR-властивості, проте слід пам'ятати, що антагоністична активність *Streptomyces* sp. DBT20 щодо широкого кола фітопатогенів обумовлена синтезом таких антибіотичних сполук як флуконазол, хлорамфенікол, рифампіцин та стрептоміцин [110]. В той час як антимікробна активність *N. vaccinii* ІМВ В-7405, до того ж не тільки щодо грибів, а й бактерій, зумовлена наявністю комплексу поверхнево-активних речовин, які за механізмом дії на мікроорганізми-мішені не викликають резистентності на відмінну від антибіотиків.

На сьогоднішній день опубліковано ряд статей в яких дослідники досліджували вплив як синтетичної, так і бактеріальної ІОК на ріст і розвиток чайних рослин [111], пшениці [112], кукурудзи та чорного горошку [113].

Так, наприклад в роботі [114] зазначено, що виділеному з коров'ячого молока штаму *Paenibacillus lentimorbus* B-30488 притаманні ріст-стимулючі властивості. За прикореневої обробки розсади табаку (*Nicotiana tabacum* cv. *White Burley*) збільшувалася довжина пагона, кореня і товщина пагона на 38%, 36% та 73% відповідно відносно контролю. Окрім того в оброблених рослин спостерігалось збільшення кількості листків та квітів в 1,2-2,8 рази порівняно з необробленим варіантом.

Проте варто відзначити, що в жодній з наведених вище робіт дослідники не визначали вплив ауксинів на врожайність рослин, що не дає можливості оцінити ефективність використовуваних фітогормонів в рослинництві. В той час як в нашій роботі було показано саме підвищення врожайності томатів, яка оцінювалася за кількістю утворених плодів.

Одержані результати засвідчують високу ефективність використання у рослинництві екзометаболітів штаму *N. vaccinii* ІМВ В-7405, до складу яких входять фітогормони і ПАР з високою антимікробною активністю.

### **3.5. Порівняння базової і вдосконаленої інтегрованої технології отримання комплексного препарату**

На основі експериментальних даних нами було розраховано ефективність використання екзометаболітів *N. vaccinii* ІМВ В-7405, одержаних згідно базової (без внесення триптофану) і вдосконаленої (з внесенням попередника) технології, у рослинництві. Для цього розраховували кількість культуральної рідини, необхідної для обробки розсади і вегетуючих рослин томатів, висаджених на площі 1 га. Дані для розрахунку наведено в табл. 3.6.

## Вихідні дані для розрахунку витрат культуральної рідини

Технологія синтезу екзометаболітів	Вміст триптофану в середовищі культивування, мг/л	Концентрація ауксинів в КР, мкг/л	Мінімальна інгібуюча концентрація ПАР*, г/л
Базова	0	77	0,006
Вдосконалена	300	3144	0,002

**Примітка.** КР – культуральна рідина; \* - мінімальна інгібуюча концентрація ПАР щодо фітопатогенів томатів;

## Стимуляція росту

Встановлено, що для обробки коренів розсади рослин, які будуть висаджені на 1 га землі при густоті посадки 4 рослини/м<sup>2</sup>, необхідно 135 л робочого розчину з концентрацією фітогормонів 14 мкг/л.

Тоді необхідна кількість фітогормонів становить:

$$135 \times 14 = 1890 \text{ мкг}$$

За реалізації базової технології для одержання такої кількості фітогормонів необхідно  $1890/77=24,7$  л культуральної рідини, де 77 мкг/л – концентрація ауксинів в культуральній рідині.

За вдосконаленої технології –  $1890/3144=0,6$  л культуральної рідини, де 3144 мкг/л – концентрація ауксинів в культуральній рідині.

## Захист від бактеріозів

В ході досліджень було встановлено, що для обробки томатів (розпилення робочого розчину в кількості 1 л/40 рослин), висаджених на 5 га землі, необхідно 5000 л робочого розчину.

Ефективна концентрація ПАР, одержаних згідно базової технології, становить 0,006 г/л. Отже необхідна кількість ПАР для приготування 5000 л робочого розчину становить  $5000 \times 0,006=30$  г. Тоді об'єм культуральної рідини становить  $30/2=15$  л, де 2 г/л – концентрація ПАР в культуральній рідині.

Концентрація в робочому розчині ПАР, одержаних згідно *вдосконаленої технології*, становить 0,002 г/л. Отже кількість ПАР для отримання необхідної кількості робочого розчину становить  $5000 \times 0,002 = 10$  г. Тоді об'єм культуральної рідини буде  $10/2 = 5$  л, де 2 г/л – концентрація ПАР в культуральній рідині.

Таким чином за реалізації базової технології синтезу екзометаболітів *N. vaccinii* ІМВ В-7405 для комплексної обробки томатів, висаджених на 5 га, необхідно близько 40 л культуральної рідини, в той час як за впровадження *вдосконаленої технології* достатньо 5,6 л культуральної рідини.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що незалежно від концентрації і моменту внесення триптофану у середовище культивування штаму *N. vaccinii* ІМВ В-7405 (лаг-фаза, кінець експоненційної) як з рафінованою, так і відпрацьованою олією спостерігали підвищення синтезу ауксинів (переважно індол-3-оцтової кислоти) у кілька разів порівняно з показниками на середовищі без цього попередника.

2. Максимальна концентрація ауксинів (5800 мкг/л) досягалася у разі добавлення 300 мг/л триптофану у середовище вирощування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 з відпрацьованою олією.

3. Антимікробна активність щодо збудників бактеріозів томатів поверхнево-активних речовин, синтезованих *N. vaccinii* ІМВ В-7405 за наявності триптофану, була в 4 рази вищою, ніж ПАР, утворених на середовищі без попередника.

4. Підвищення синтезу ауксинів корелювало з активністю триптофантрансамінази: за наявності 300 мг/л триптофану у середовищі культивування штаму ІМВ В-7405, активність цього ферменту становила 833 нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка, що в 5,3 рази вище, ніж на середовищі без попередника (156 нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка).

5. Обробка кореневої системи розсади томатів і вегетуючих рослин екзометаболітами *N. vaccinii* ІМВ В-7405 супроводжувалася підвищенням врожайності рослин на 70-90%.

6. Теоретичний розрахунок показав, що для обробки томатів, висаджених на 5 га, необхідно 40 л культуральної рідини, одержаної за базової технології, у той час як за реалізації вдосконаленої технології кількість культуральної рідини становить всього 5,6 л.

7. Отримані результати засвідчують можливість розробки економічно вигідної технології утилізації токсичного відходу (відпрацьованої соняшникової олії) і створення комплексного мікробного препарату з антимікробними і ріст-стимулювальними властивостями на основі *N. vaccinii*

ІМВ В-7405 для використання у рослинництві.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Пирог Т.П., Ключка Л.В., Клименко Н.О., Шевчук Т.А., Іутинська Г.О. Інтегровані технології мікробного синтезу кількох цільових продуктів. *Мікроб. журн.* 2019; 81(6): 110-130. doi.: 10.15407/microbiolj81.06.110.
2. Pirog T., Leonova N., Shevchuk T., Savenko I., Iutinska G. [Synthesis of phytohormones bacteria of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 – producers of surface-active substances]. *Proc. Nat. Acad. Sci. Belarus. Biological series*, 2016; 1: 90–5. Russian. <http://vestibio.belnauka.by/jour/article/view/195>
3. Pirog T., Iutynska G.O., Leonova N.O., Beregova K.A., Shevchuk T.A. Microbial synthesis of phytohormones. *Biotech Acta.* 2018; 11(1): 5-24. doi. [10.15407/biotech11.01.005](http://10.15407/biotech11.01.005)
4. Ящук І.В., Шлончак Г.А. Досвід вирощування сіянців сосни звичайної із застосуванням регуляторів росту рослин у ДП «Клавдієвське ЛП». *Лісництво і агролісомеліорація.* 2019; 134: 43-46.
5. Цыганкова В.А., Галкина Л.А., Мусатенко Л.И., Сытник К.М. Генетический и эпигенетический контроль роста и развития растений. Гены биосинтеза ауксинов и ауксин-регулируемые гены, контролирующие деление и растяжение клеток растений. *Биополимеры і клітина.* 2005; 21(2): 107-133. doi: [10.7124/bs.0006E2](http://10.7124/bs.0006E2)
6. Duca D.R., Rose D.R., Glick B.R. Indole acetic acid overproduction transformants of the rhizobacterium *Pseudomonas* sp. UW4. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2018; 111(9):1645-1660. doi: 10.1007/s10482-018-1051-7.
7. Lehmann T., Hoffmann M., Hentrich M., Pollmann S. Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: a widely distributed way of indole-3-acetic acid production? *Eur. J. Cell Biol.* 2010; 89(12): 895-905. doi: 10.1016/j.ejcb.2010.06.021.
8. Olanrewaju O.S., Glick B.R., Babalola O.O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2017; 33(11): 197. doi: 10.1007/s11274-017-2364-9.

9. Метаболізм триптофану [Електронний ресурс] // KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Режим доступу: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?map00380](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00380)

10. Carboneschi M., Decorosi F., Biancalani C., Ortenzi M.V., Macconi S., Giovannetti L., Viti C., Campanella B., Onor M., Bramanti E., Tegli S. Indole-3-acetic acid in plant-pathogen interactions: a key molecule for in planta bacterial virulence and fitness. *Res. Microbiol.* 2016; 167(9-10):774-787. doi: 10.1016/j.resmic.2016.09.002.

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

12. 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. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2015; 4 (3): 296-303. doi: [10.1016/j.bcab.2015.04.002/](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.04.002/)

13. Rodrigues E.P., Soares C.P., Galvão P.G., Imada E.L., Simões-Araújo J.L., Rouws L.F., de Oliveira A.L., Vidal M.S., Baldani J.I. Identification of Genes Involved in Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 Strain Using Transposon Mutagenesis. *Front. Microbiol.* 2016; 7:1572. doi: [10.3389/fmicb.2016.01572](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01572).

14. Estenson K., Hurst G.B., Standaert R.F., Bible A.N., Garcia D., Chourey K., Doktycz M.J., Morrell-Falvey J.L. Characterization of Indole-3-acetic Acid Biosynthesis and the Effects of This Phytohormone on the Proteome of the Plant-Associated Microbe *Pantoea* sp. YR343. *J. Proteome Res.* 2018;17(4):1361-1374. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00708.

15. Parsons C.V., Harris D.M., Patten C.L. Regulation of indole-3-acetic acid biosynthesis by branched-chain amino acids in *Enterobacter cloacae* UW5. *FEMS Microbiol. Lett.* 2015; 362(18):fnn153. doi: 10.1093/femsle/fnn153.

16. Rivera D., Mora V., Lopez G., Rosas S., Spaepen S., Vanderleyden J., Cassan F. New insights into indole-3-acetic acid metabolism in *Azospirillum brasilense*. *J. Appl. Microbiol.* 2018. doi: 10.1111/jam.14080.
17. Guo D., Kong S., Chu X., Li X., Pan H. De Novo Biosynthesis of Indole-3-acetic Acid in Engineered *Escherichia coli*. *J. Agric. Food Chem.* 2019; 67(29):8186-8190. doi: 10.1021/acs.jafc.9b02048.
18. Lin H.R., Shu H.Y., Lin G.H. Biological roles of indole-3-acetic acid in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiol. Res.* 2018; 216:30-39. doi:10.1016/j.micres.2018.08.004.
19. Duca D., Lorv J., Patten C.L., Rose D., Glick B.R. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2014; 106(1):85-125. doi:10.1007/s10482-013-0095-y.
20. McClerklin S.A., Lee S.G., Harper C.P., Nwumeh R., Jez J.M., Kunkel B.N. Indole-3-acetaldehyde dehydrogenase-dependent auxin synthesis contributes to virulence of *Pseudomonas syringae* strain DC3000. *PLoS Pathog.* 2018;14(1):e1006811. doi: 10.1371/journal.ppat.1006811.
21. Torres D., Benavidez I., Donadio F., et al. New insights into auxin metabolism in *Bradyrhizobium japonicum*. *Res. Microbiol.* 2018; 169(6): 313–323. doi: 10.1016/j.resmic.2018.04.002.
22. Liu W.H., Chen F.F., Wang C.E., et al. Indole-3-Acetic Acid in *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007: Enzymatic Identification of the Indole-3-Acetamide Synthesis Pathway. *Front Microbiol.* 2019; 10:2559. doi:10.3389/fmicb.2019.02559.
23. Lacroix B., Gizatullina D.I., Babst B.A., Gifford A.N., Citovsky V. *Agrobacterium* T-DNA-encoded protein Atu6002 interferes with the host auxin response. *Mol. Plant. Pathol.* 2014; 15(3): 275–283. doi:10.1111/mpp.12088.
24. Aragón I.M., Pérez-Martínez I., Moreno-Pérez A., Cerezo M., Ramos C. New insights into the role of indole-3-acetic acid in the virulence of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2014; 356(2): 184–192. doi:10.1111/1574-6968.12413.

25. Zhang P., Jin T., Kumar Sahu S. et al. The Distribution of Tryptophan-Dependent Indole-3-Acetic Acid Synthesis Pathways in Bacteria Unraveled by Large-Scale Genomic Analysis. *Molecules*. 2019; 24(7): 1411. doi:10.3390/molecules24071411.
26. Метаболізм триптофану в *Agrobacterium tumefaciens* Ach5. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [Електронний ресурс] // Режим доступу: [https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight\\_pathway?scale=1.0&map=atf00380&keyword=](https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=atf00380&keyword=)
27. Huang Y.Y., Cho S.T., Lo W.S., Wang Y.C., Lai E.M., Kuo C.H. Complete Genome Sequence of *Agrobacterium tumefaciens* Ach5. *Genome Announc*. 2015; 3(3): e00570-15. doi:10.1128/genomeA.00570-15.
28. Upadhyay A., Srivastava S. Characterization of a new isolate of *Pseudomonas fluorescens* strain Psd as a potential biocontrol agent. *Lett. Appl. Microbiol*. 2008; 47(2): 98–105. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02390.x.
29. Upadhyay A., Srivastava S. Evaluation of multiple plant growth promoting traits of an isolate of *Pseudomonas fluorescens* strain Psd. *Indian J. Exp. Biol*. 2010; 48(6): 601–609.
30. Kochar M., Upadhyay A., Srivastava S. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. *Res. Microbiol*. 2011; 162(4): 426–435. doi:10.1016/j.resmic.2011.03.006.
31. Al-Hosni K., Shahzad R., Latif Khan A., Muhammad Imran Q., Al Harrasi A., Al Rawahi A., Asaf S., Kang S.-M., Yun B.-W., Lee I.-J. *Preussia* sp. BSL-10 producing nitric oxide, gibberellins, and indole acetic acid and improving rice plant growth. *J. Plant Interact*. 2018; 13: 112–118. doi: 10.1080/17429145.2018.1432773.
32. Manulis S., Shafrir H., Epstein E., Lichter A., Barash I. Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. *Microbiology*. 1994; 140 (Pt 5): 1045–1050. doi:10.1099/13500872-140-5-1045.

33. Lin L., Xu X. Indole-3-acetic acid production by endophytic *Streptomyces* sp. En-1 isolated from medicinal plants. *Curr. Microbiol.* 2013; 67(2): 209–217. doi:10.1007/s00284-013-0348-z.
34. Liu D., Yan R., Fu Y., Wang X., Zhang J., Xiang W. Antifungal, Plant Growth-Promoting, and Genomic Properties of an Endophytic Actinobacterium *Streptomyces* sp. NEAU-S7GS2. *Front Microbiol.* 2019; 10: 2077. doi:10.3389/fmicb.2019.02077.
35. Sousa J.A.J., Olivares F.L. Plant growth promotion by streptomycetes: ecophysiology, mechanisms and applications. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 2016; 3(24): 1-12. doi:10.1186/s40538-016-0073-5.
36. Tsavkelova E., Oeser B., Oren-Young L. et al. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. *Fungal Genet. Biol.* 2012; 49(1): 48–57. doi:10.1016/j.fgb.2011.10.005.
37. Legault G.S., Lerat S., Nicolas P., Beaulieu C. Tryptophan regulates thaxtomin A and indole-3-acetic acid production in *Streptomyces scabiei* and modifies its interactions with radish seedlings. *Phytopathology.* 2011;101(9): 1045-1051. doi:10.1094/PHYTO-03-11-0064.
38. Luo K., Rocheleau H., Qi P.F., Zheng Y.L., Zhao H.Y., Ouellet T. Indole-3-acetic acid in *Fusarium graminearum*: Identification of biosynthetic pathways and characterization of physiological effects. *Fungal. Biol.* 2016; 120(9): 1135–1145. doi:10.1016/j.funbio.2016.06.002.
39. Sun S.L., Yang W.L., Fang W.W., Zhao Y.X., Guo L., Dai Y.J. The Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Variovorax boronicumulans* CGMCC 4969 Regulates the Level of Indole-3-Acetic Acid Synthesized from Indole-3-Acetonitrile. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018; 84(16): e00298-18. doi:10.1128/AEM.00298-18.
40. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 2007; 31(4): 425–448. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x.

41. Cosracurta A., Vanderleyden J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 1995; 21(1): 1-18. doi:10.3109/10408419509113531.
42. Ambawade M.S., Pathade G.R. Production of Indole Acetic Acid (IAA) by *Stenotrophomonas maltophilia* BE25 isolated from roots of banana (musa pp). *Int. J. Sci. Res.* 2015; 4(1): 2644-2650.
43. Wagi S., Ahmed A. *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *Peer J.* 2019; 7: e7258. doi: 10.7717/peerj.7258.
44. Dasri K., Kaewharn J., Kanso S., Sangchanjirader S. Optimization of indole-3-acetic acid (IAA) production by rhizobacteria isolated from epiphytic orchids. *KKU Res. J.* 2014; 19: 268-275.
45. Kumari S., Prabha C., Singh A., Kumari S., Kiran S. Optimization of indole-3-acetic acid production by diazotrophic *B. subtilis* DR2 (KP455653), isolated from rhizosphere of *Eragrostis cynosuroides*. *Int. J. Pharm. Med. Bio. Sci.* 2018; 7(2): 20-27. doi: 10.18178/ijpmb.7.2.20-27.
46. Jeyanthi V., Ganesh P. Production, optimization and characterization of phytohormone indole acetic acid by *Pseudomonas fluorescens*. *Int. J. Pharm. Bio. Arch.* 2013; 4(2): 514-520.
47. Bose A., Kher M.M., Nataraj M., Keharia H. Phytostimulatory effect of indole-3-acetic acid by *Enterobacter cloacae* SN19 isolated from *Teramnus labialis* (L. f.) spreng rhizosphere. *Biocatal. Agric. Biotech.* 2016; 6: 128-137. doi: 10.1016/j.bcab.2016.03.005.
48. Ozdal M., Ozdal O.G., Sezen A., Algur O.F., Kurbanoglu E.B. Continuous production of indole-3-acetic acid by immobilized cells of *Arthrobacter agilis*. *3 Biotech.* 2017; 7(1): 23. doi: 10.1007/s13205-017-0605-0.
49. Nutaratat P., Monprasit A., Srisuk N. 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.* 2017; 7(5): 305. doi: 10.1007/s13205-017-0937.

50. Naveed M., Qureshi M.A., Zahir Z.A. L-Tryptophan-dependent biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) improves plant growth and colonization of maize by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Ann. Microbiol.* 2015; 65: 1381–1389. doi:10.1007/s13213-014-0976-y.
51. Shim J., Kim J.W., Shea P.J., Oh B.T. IAA production by *Bacillus* sp. JH 2-2 promotes Indian mustard growth in the presence of hexavalent chromium. *J. of Basic Microb.* 2015; 55(5): 652-658. doi:10.1002/jobm.201400311.
52. Mon Myo E., Ge B., Ma J., Cui H., Liu B., Shi L. et al. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces fradiae* NKZ-259 and its formulation to enhance plant growth. *BMC Microbiol.* 2019; 19(1): 1–14. doi: 10.1186/s12866-019-1528-1.
53. Nutaratat P., Srisuk N., Arunrattiyakorn P., Limtong S. Indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in the basidiomycetous yeast *Rhodospiridium paludigenum*. *Arch. Microbiol.* 2016; 198(5): 429-437. doi:10.1007/s00203-016-1202-z.
54. Fu S-F., Sun P-F., Lu H-Y., Wei J-Y., Xiao H-S., Fang W-T. et al. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. *Fungal Bio.* 2016; 120: 433-448.
55. Bunsangiam S., Sakpuntoon V. SrisukN., Ohashi T., Fujiyama K., Limtong S. Biosynthetic pathway of indole-3-acetic acid in basidiomycetous yeast *Rhodospiridiobolus fluvialis*. *Mycobiology.* 2019; 47(3): 292-300. doi: 10.1080/12298093.
56. Swetha S., Padmavathi T. Biosynthesis, characterization and optimization of auxins by *Piriformospora indica*: it's impact on growth of *Solanum melongena* L. cultivars. *J. Sci. Ind. Res.* 2016; 75: 45-50.
57. Chandra S., Askari K., Kumari M. Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth. *J. Gen. Engineer. Biotechnol.* 2018; 16(2): 581-586. doi: 10.1016/j.jgeb.2018.09.001.

58. Hasuty, A., Choliq A., Hidayat I. Production of Indole Acetic Acid (IAA) by *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* and *Rhodococcus aff. qingshengii*. *Int. J. of Agric. Technol.* 2018; 14(3): 299-312.
59. Molina R., Rivera D., Mora V., López G., Rosas S., Spaepen S., Vanderleyden J., Cassán F. Regulation of IAA Biosynthesis in *Azospirillum brasilense* Under Environmental Stress Conditions. *Curr. Microbiol.* 2018; 75(10): 1408-1418. doi: 10.1007/s00284-018-1537-6.
60. Ouyang L., Pei H., Xu Z. 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. *Arch. Microbiol.* 2017; 199(3): 425-432. doi: 10.1007/s00203-016-1312-7.
61. Феоктистова Н.В., Марданова А.М., Хадиева Г.Ф., Шарипова М.Р. Ризосферные бактерии. *Ученые записи казанского университета. Серия естественные науки.* 2016; 158(2): 207-224.
62. Kudoyarova G., Arkhipova T., Korshunova T., Bakaeva M., Loginov O., Dodd I.C. Phytohormone Mediation of Interactions Between Plants and Non-Symbiotic Growth Promoting Bacteria Under Edaphic Stresses. *Front. Plant Sci.* 2019; 10:1368. doi:10.3389/fpls.2019.01368.
63. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Ястреб Т.О., Луговая А.А. Сигнальные посредники в реализации физиологических эффектов стрессовых фитогормонов. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія біологія.* 2016; 1(37): 42-62.
64. Pirog T. P., Shevchuk T. A., Voloshina I. N., Gregirchak N. N. Use of claydite-immobilized oil-oxidizing microbial cells for purification of water from oil // *Appl. Biochem. and Microbiol.* – 2005. – V. 4, No1. – P. 51-55.
65. Методические рекомендации по определению фитогормонов. Киев: Ин-т ботаники АН УССР. 1988, 78 с.
66. Mazzola P., Jozala A., Lencastre-Novaes L., Moriel P., Vessoni-Penna T. Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2009; 45 (2) :241–248.

67. Nutaratat P., Monprasit A., Srisuk N. 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.* 2017; 7(5): 305. doi: 10.1007/s13205-017-0937-
68. Panasyuk E.V., Nikityuk L.V., Iutinska G.O. Influence of cultivation conditions on antimicrobial properties of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants. *Biotechnologia Acta.* 2016; 9(1): 38–45. doi: 10.15407/biotech9.01.038.
69. Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пирог Т.П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. Київ. 2010, 327 с.
70. Mon Myo E., Ge B., Ma J., Cui H., Liu B., Shi L. et al. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces fradiae* NKZ-259 and its formulation to enhance plant growth. *BMC Microbiol.* 2019; 19(1): 1–14. doi: 10.1186/s12866-019-1528-1.
71. Wagi S., Ahmed A. *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *Peer J.* 2019; 7: e7258. doi: 10.7717/peerj.7258.
72. Chandra S., Askari K., Kumari M. Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth. *J. Gen. Engineer. Biotechnol.* 2018; 16(2): 581-586. doi: 10.1016/j.jgeb.2018.09.001
73. Nutaratat P., Monprasit A., Srisuk N. 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.* 2017; 7(5): 305. doi: 10.1007/s13205-017-0937-
74. Wu T., Xu J., Xie W., Yao Z., Yang H., Sun C. *Pseudomonas aeruginosa* L10: a hydrocarbon-degrading, biosurfactant-producing and plant-growth-promotion endophytic bacterium isolated from a reed (*Phragmites australis*). *Front. Microbiol.* 2018; 9: 1087. doi: 10.3389/fmicb.2018.01087
75. Lotfabad B., Shahcheraghi F., Shooraj F. Assessment of antibacterial capability of rhamnolipids produced by two indigenous *Pseudomonas aeruginosa*

strains. *Jundishapur. J. Microbiol.* 2013; 6(1): 29–35.

76. Adeniji A.A., Aremu O.S., Babalola O.O. Selecting lipopeptide-producing, Fusarium-suppressing *Bacillus* spp.: Metabolomic and genomic probing of *Bacillus velezensis* NWUMFkBS10.5. *Microbiology Open.* 2019; 8(6): t00742. doi: 10.1002/mbo3.742.

77. Benitez L.B., Velho R.V., Lisboa M.P., Medina L.F., Brandelli A. Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. *J. Microbiol.* 2010; 48(6): 791-797. doi: 10.1007/s12275-010-0164-0.

78. Hazarika D.J., Goswami G., Gautom T., Parveen A., Das P., Barooah M., Boro R.C. Lipopeptide mediated biocontrol activity of endophytic *Bacillus subtilis* against fungal phytopathogens. *BMC Microbiol.* 2019; 19(1):71. doi:10.1186/s12866-019-1440-8.

79. Mnif I., Hammami I., Triki M.A., Azabou M.C., Ellouze-Chaabouni S., Ghribi D. Antifungal efficiency of a lipopeptide biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* SPB1 versus the phytopathogenic fungus, *Fusarium solani*. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015; (22):18137-18147. doi: 10.1007/s11356-015-5005-6.

80. Mnif I., Grau-Campistany A., Coronel-León J., Hammami I., Triki M.A., Manresa A., Ghribi D. Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016; 23(7): 6690-6699. doi: 10.1007/s11356-015-5826-3.

81. Sen S., Borah S.N., Bora A., Deka S. Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3. *Microb Cell Fact.* 2017;16(1): 95. doi: 10.1186/s12934-017-0711-z.

82. Tran H., Ficke A., Asiimwe T., Höfte M., Raaijmakers J.M. Role of cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytol.* 2007; 175:731–742.

83. Velho R.V., Medina L.F., Segalin J., Brandelli A. Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi. *Folia Microbiol (Praha)*. 2011; 56(4): 297-303. doi: 10.1007/s12223-011-0056-7.
84. Deepak R., Jayapradha R. Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus thuringiensis* pak2310: A potential antagonist against *Fusarium oxysporum*. *J. Mycol. Med.* 2015; 25(1): e15–e24. doi:10.1016/j.mycmed.2014.10.011
85. Goswami D., Handique P.J., Deka S. Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium sacchari* – the causal organism of pokkah boeng disease of sugarcane. *J. Basic Microbiol.* 2014; 54(6): 548–557. doi:10.1002/jobm.201200801
86. Hazarika D.J., Goswami G., Gautom T. et al. Lipopeptide mediated biocontrol activity of endophytic *Bacillus subtilis* against fungal phytopathogens. *BMC Microbiol.* 2019; 19(1): 71. doi:10.1186/s12866-019-1440-8
87. Yan F., Xu S., Guo J., Chen Q., Meng Q., Zheng X. Biocontrol of post-harvest *Alternaria alternata* decay of cherry tomatoes with rhamnolipids and possible mechanisms of action. *J. Sci. Food Agric.* 2015; 95(7): 1469–1474. doi:10.1002/jsfa.6845
88. Zhang D.D., Guo X.J., Wang Y.J., Gao T.G., Zhu B.C. Novel screening strategy reveals a potent *Bacillus* antagonist capable of mitigating wheat take-all disease caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Lett Appl Microbiol.* 2017; 65(6): 512–519. doi:10.1111/lam.12809
89. Sathi Reddy K., Yahya Khan M., Archana K., Gopal Reddy M., Hameeda B. Utilization of mango kernel oil for the rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* DR1 towards its application as biocontrol agent. *Bioresour. Technol.* 2016; 221: 291–299. doi:10.1016/j.biortech.2016.09.041
90. Sen S., Borah S.N., Bora A., Deka S. Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3. *Microb. Cell Fact.* 2017; 16(1): 95. doi:10.1186/s12934-017-0711-z

91. Ben Abdallah D., Frikha-Gargouri O., Tounsi S. *Bacillus amyloliquefaciens* strain 32a as a source of lipopeptides for biocontrol of *Agrobacterium tumefaciens* strains. *J. Appl. Microbiol.* 2015; 119(1): 196–207. doi:10.1111/jam.12797
92. Frikha-Gargouri O., Ben Abdallah D., Ghorbel I. et al. Lipopeptides from a novel *Bacillus methylotrophicus* 39b strain suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants. *Pest. Manag. Sci.* 2017; 73(3): 568–574. doi:10.1002/ps.4331
93. Abdallah D.B., Tounsi S., Gharsallah H., Hammami A., Frikha-Gargouri O. Lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain 32a as promising biocontrol compounds against the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2018; 25(36): 36518–36529. doi:10.1007/s11356-018-3570-1.
94. Le K.D., Kim J., Yu N.H., Kim B., Lee C.W., Kim J.C. Biological Control of Tomato Bacterial Wilt, Kimchi Cabbage Soft Rot, and Red Pepper Bacterial Leaf Spot Using *Paenibacillus elgii* JCK-5075. *Front. Plant. Sci.* 2020; 11:775. doi: 10.3389/fpls.2020.00775.
95. Kim J., Le K.D., Yu N.H., Kim J.I., Kim J.C., Lee C.W. Structure and antifungal activity of pelgipeptins from *Paenibacillus elgii* against phytopathogenic fungi. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2020; 163:154-163. doi: 10.1016/j.pestbp.2019.11.009.
96. Liu Y., Teng K., Wang T., Dong E., Zhang M., Tao Y., Zhong J. Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize. *J. Appl. Microbiol.* 2020; 128(1): 242-254. doi: 10.1111/jam.14459.
97. Chen M., Wang J., Liu B., Zhu Y., Xiao R., Yang W., Ge C., Chen Z. Biocontrol of tomato bacterial wilt by the new strain *Bacillus velezensis* FJAT-46737 and its lipopeptides. *BMC Microbiol.* 2020; 20(1): 160. doi: 10.1186/s12866-020-01851-2.

98. Cao Y., Pi H., Chandransu P. et al. Antagonism of Two Plant-Growth Promoting *Bacillus velezensis* Isolates Against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 4360. doi:10.1038/s41598-018-22782-z.

99. Azaiez S., Ben Slimene I., Karkouch I., Essid R., Jallouli S., Djebali N., Elkahoui S., Limam F., Tabbene O. Biological control of the soft rot bacterium *Pectobacterium carotovorum* by *Bacillus amyloliquefaciens* strain Ar10 producing glycolipid-like compounds. *Microbiol. Res.* 2018; 217: 23-33. doi: 10.1016/j.micres.2018.08.013.

100. Tsavkelova E. A.. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl. Biochem. and Microb.* 2006; 42(2): 117-126.

101. Агафонова Н. В. Таксономическая и функциональная характеристика аэробных метилотрофных бактерий-фитосимбионтов: дисс. ... канд. биол. Наук : 03.02.03 / ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им.Г.К.Скрябина Российской академии наук. Пушкино, 2017. 200 с.

102. Пирог Т.П., П'ятецька Д.В., Клименко Н.О., Шевчук Т.А., Леонова Н.О. Інтенсифікація синтезу ауксинів у продуцента поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405. *Наукові праці НУХТ.* 2019; 25(6): 16-22.

103. Goudjal Y., Toumatia O., Sabaou N., Barakate M., Mathieu F., Zitouni A. Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: indole-3-acetic acid production and tomato plants growth promoting activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2013; 29(10): 1821-1829. doi: 10.1007/s11274-013-1344-y.

104. Goudjal Y., Toumatia O., Yekkour A., Sabaou N., Mathieu F., Zitouni A. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiol. Res.* 2014; 169(1): 59-65. doi: 10.1016/j.micres.2013.06.014.

105. Guan L., Tayengwa R., Cheng Z.M., Peer W.A., Murphy A.S., Zhao M. Auxin regulates adventitious root formation in tomato cuttings. *BMC Plant Biol.* 2019; 19(1): 435. doi: 10.1186/s12870-019-2002-9.
106. Hsu C.K., Micallef S.A. Plant-mediated restriction of *Salmonella enterica* on tomato and spinach leaves colonized with *Pseudomonas* plant growth-promoting rhizobacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 2017; 259: 1-6. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.012.
107. Passari A.K., Mishra V.K., Singh G., Singh P., Kumar B., Gupta V.K., Sarma R.K., Saikia R., Donovan A.O., Singh B.P. Insights into the functionality of endophytic actinobacteria with a focus on their biosynthetic potential and secondary metabolites production. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 11809. doi: 10.1038/s41598-017-12235-4.
108. Passari A.K., Upadhyaya K., Singh G., Abdel-Azeem A.M., Thankappan S., Uthandi S., Hashem A., Abd Allah E.F., Malik J.A., As A., Gupta V.K., Ranjan S., Singh B.P. Enhancement of disease resistance, growth potential, and photosynthesis in tomato (*Solanum lycopersicum*) by inoculation with an endophytic actinobacterium, *Streptomyces thermocarboxydus* strain BPSAC147. *PLoS One.* 2019; 14(7): e0219014. doi: 10.1371/journal.pone.0219014.
109. Cao P., Liu C., Sun P., Fu X., Wang S., Wu F., Wang X. An endophytic *Streptomyces* sp. strain DHV3-2 from diseased root as a potential biocontrol agent against *Verticillium dahliae* and growth elicitor in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2016; 109(12): 1573-1582. doi: 10.1007/s10482-016-0758-6.
110. Passari A.K., Chandra P., Zothanpuia, Mishra V.K., Leo V.V., Gupta V.K., Kumar B., Singh B.P. Detection of biosynthetic gene and phytohormone production by endophytic actinobacteria associated with *Solanum lycopersicum* and their plant-growth-promoting effect. *Res. Microbiol.* 2016; 167(8): 692-705. doi: 10.1016/j.resmic.2016.07.001.

111. Borah A., Das R., Mazumdar R., Thakur D. Culturable endophytic bacteria of *Camellia* species endowed with plant growth promoting characteristics. *J. Appl. Microbiol.* 2019; 127(3): 825-844. doi: 10.1111/jam.14356.
112. Gong Y., Bai J.L., Yang H.T., Zhang W.D., Xiong Y.W., Ding P., Qin S. Phylogenetic diversity and investigation of plant growth-promoting traits of actinobacteria in coastal salt marsh plant rhizospheres from Jiangsu, China. *Syst. Appl. Microbiol.* 2018; 41(5): 516-527. doi: 10.1016/j.syapm.2018.06.003.
113. Karthik C., Elangovan N., Kumar T.S., Govindharaju S., Barathi S., Oves M., Arulselvi P.I. Characterization of multifarious plant growth promoting traits of rhizobacterial strain AR6 under Chromium (VI) stress. *Microbiol. Res.* 2017; 204:65-71. doi: 10.1016/j.micres.2017.07.008.
114. Kumar S., Chauhan P.S., Agrawal L., Raj R., Srivastava A. et al. *Paenibacillus lentimorbus* Inoculation Enhances Tobacco Growth and Extenuates the Virulence of Cucumber mosaic virus. *PLOS ONE.* 2016; 11(3): e0149980. doi: 10.1371/journal.pone.0149980.

# ДОДАТКИ

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ТА НАГОРОД

### Нагороди

1. Переможець конкурсу наукових студентських робіт від корпорації Артеріум.
2. Переможець II туру Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт, диплом III ступеня.
3. Переможець V Всеукраїнського конкурсу студентів і молодих вчених «МОЛОДЬ І ПРОГРЕС У РАЦІОНАЛЬНОМУ ПРИРОДОКОРИСТУВАННІ», диплом III ступеня.

### Статті у фахових журналах

1. Пирог Т.П., Ключка Л.В., Клименко Н.О., Шевчук Т.А., Іутинська Г.О. Інтегровані технології мікробного синтезу кількох цільових продуктів. *Мікроб. журн* (база даних Scopus). 2019; 81(6): 110-130. doi.: 10.15407/microbiolj81.06.110.
2. Piatetska D.V., Leonova N.O., Pirog T.P., Klymenko N.O. Yield of tomatoes and peppers under the influence of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017. *J. Agr. Environ.* 2019; 3(11): 1-7. doi.: 10.23649/jae.2019.3.11.4.
3. Пирог Т.П., П'ятецька Д.В., Клименко Н.О., Шевчук Т.А., Леонова Н.О. Інтенсифікація синтезу ауксинів у продуцента поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. *Наукові праці НУХТ*. 2019; 25(6): 16-22.
4. Pirog T., Leonova N., Piatetska D., Klymenko N., Shevchuk T. Influence of tryptophan on auxin-synthesizing ability of surfactant producer *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241. *Ukr. Food J.* 2020; 9(1): 175-184. doi: 10.24263/2304-974X-2020-9-1-15.

5. Т.Р. Pirog, N.O. Leonova, D.V. Piatetska, N.O. Klymenko, V.I. Zhdanyuk, T.A. Shevchuk. Synthesis of auxins by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 in the presence of tryptophan. *Мікроб. журн.* 2020; (подано до друку).

#### **Статті у збірниках матеріалів міжнародних конференцій**

1. Клименко Н.А., Жданюк В.И., Пятецкая Д.В., Пирог Т.П. Влияние триптофана на синтез ауксинов продуцентами поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405 и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ac-5017 // XX Международная научная конференция студентов и магистрантов, «Научный поиск молодежи XXI века» (г. Горки, Беларусь, 24 ноября 2020 г.) (принято до друку орг. комітетом)

2. Клименко Н.А., Жданюк В.И., Пятецкая Д.В., Пирог Т.П. Синтез комплекса экзометаболитов штаммом *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 с целью создания препарата для растениеводства // Международная научно-практическая конференция «Селекция и генетика: инновации и перспективы» (г. Горки, Беларусь, 20 ноября 2020 г.). – С. 226-228.

#### **Тези у збірниках вітчизняних конференцій**

1. Клименко Н.О., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П., Леонова Н.О., Шевчук Т.А. Вплив попередника біосинтезу на утворення ауксинів продуцентом поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 // Збірник наукових праць «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології». Випуск 6 (м. Харків, 7-8 листопада 2019 р.). – С. 222-223.

2. Клименко Н.О., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П., Леонова Н.О., Шевчук Т.А. Синтез гіберелінів продуцентами поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405, *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 та *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ac-5017 // Збірник тез матеріалів VIII Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції» (5-6 листопада 2019 р., м. Київ). – С. 31-33.

3. Клименко Н.О., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П., Леонова Н.О., Шевчук Т.А. Інтенсифікація синтезу фітогормонів ауксинової природи продуцента поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 // Збірник тез матеріалів VIII Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції» (5-6 листопада 2019 р., м. Київ.). – С. 33-35.

4. Клименко Н.О., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П. Вплив якості олії на синтез ауксинів продуцентом поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 // Біотехнологія: звершення та надії: збірник тез VIII Міжнародної науково-практичної онлайн конференції студентів, аспірантів та молодих вчених (15 листопада 2019 року, м. Київ). – С. 89-91.

5. Клименко Н.О., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П.. Інтенсифікація синтезу ауксинів штаму *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 за умов росту на відпрацьованій олії // Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Науково-інноваційний супровід збалансованого природокористування» (м. Рівне, 31 жовтня 2019 р.). – С. 80-82.

6. Клименко Н.О., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В. Вплив попередника на синтезу ауксинів продуцентом поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 // XIV Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» присвячена 135-річчю від дня народження Олександра Володимировича Палладіна (с. Київ, 24 квітня 2020 р.). – С. 42.

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

8. Жданюк В.І., Клименко Н.О., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П. Інтенсифікація синтезу ауксинів штамом *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-

5017 за умов росту на етанолі // Міжнародна науково-практична конференція «Перспективні матеріали та інноваційні технології: біотехнологія, прикладна хімія та екологія» (м. Київ, 14-15 травня 2020 р.). – С. 51.

9. Pirog T.P., Leonova N.O., Klymenko N.O., Zhdanyuk V.I., Piatetska D.V., Shevchuk T.A. Influence of tryptophan on auxin-synthesizing ability of surfactant producer *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 // Програма та тези матеріалів ІХ Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» (м. Київ, НУХТ, 10-11 листопада 2020 р.). – С. 19-20.

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

11. Клименко Н.О., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П. Синтез ауксинів продуцентом поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на промислових відходах // Матеріали Х Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції «Техногенно-екологічна безпека України: стан та перспективи розвитку / ТЕБ-2020» (м. Ірпінь, 20-29 жовтня 2020 р.). – С. 180-183.

12. Клименко Н.О., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П. вплив триптофану на синтез комплексу екзометаболітів штаму *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 // Матеріали наукової конференції «Сучасні проблеми генетики, біотехнології і біохімії сільськогосподарських рослин» (м. Одеса, 21 жовтня 2020 р.). (прийнято до друку орг. комітетом)

13. Клименко Н.О., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П. Вплив триптофану на активність триптофантрансамінази штаму *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 // V Міжнародна інтернет-конференція

«Технологічні та біохармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (м. Харків, 26 листопада 2020 р.).

14. Клименко Н.О., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П. Вплив попередника на синтез ауксинів продуцентом поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 // II Міжнародна науково-практична конференція «Перспективи еко-інноваційного розвитку сільськогосподарського виробництва» (м. Полтава, 20 листопада 2020 р.). – С. 124-125.

15. Клименко Н.О., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П. Вплив попередника синтезу ауксинів на активність триптофантрансамінази *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 // VI Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні питання розвитку біології та екології» (м. Вінниця, 21-22 жовтня 2020 р.). – С. 56-58.

16. Клименко Н.О., Жданюк В.І., П'ятецька Д.В., Пирог Т.П. Вплив попередника синтезу ауксинів на активність триптофантрансамінази *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 // Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Майбутній науковець – 2020» (м. Сєвєродонецьк, 4 грудня 2020 р.). – С. 31-32.

### **Тези у збірниках закордонних конференцій**

1. Клименко Н.А., Пятецкая Д.В., Пирог Т.П. Влияние экзометаболитов *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 на урожайность ячменя // Техническое и кадровое обеспечение инновационных технологий в сельском хозяйстве : материалы Международной научно-практической конференции (Минск, 24–25 октября 2019 года). – Ч. 2. – С. 176-177.

2. Клименко Н.А., Пятецкая Д.В., Пирог Т.П. Образование ауксинов продуцентом поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 в присутствии предшественника биосинтеза // Международная научная конференция молодых ученых «Фундаментальные исследования и

инновации в молекулярной биологии, биотехнологии, биохимии» (г. Алматы, Республика Казахстан, 28-29 ноября, 2019 г.). – С. 81.

3. Клименко Н.А., Жданюк В.И., Пятецкая Д.В., Пирог Т.П. Влияние качества подсолнечного масла на синтез ауксинов штаммом *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405 // Международная научно-практическая конференция молодых ученых «МОЛОДЕЖЬ И ИННОВАЦИИ – 2020» посвященная 180-летию УО БГСХА (г. Горки, Беларусь, 14-15 мая, 2020 г.).

4. Жданюк В.И. Клименко Н.А. Интенсификация синтеза ауксинов и влияние экзометаболитов *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405 на урожайность томатов // 105-я Международная научно-практическая конференция студентов и магистрантов «Студенты – науке и практике АПК» (г. Витебск, Беларусь, 20-21 мая 2020 г.). – С. 334.

5. Клименко Н.А., Пятецкая Д.В., Жданюк В.И., Пирог Т.П. Интенсификация синтеза фитогормонов ауксиновой природы у продуцента поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 // Сборник тезисов республиканской научной конференции «Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии» (г. Ташкент, Республика Узбекистан, 12 августа 2020 г.). – С. 261-263.

6. Zhdaniuk V., Piatetska D., Klymenko N., Pirog T. Synthesis of auxins by strains *Acinetobacter calcoaceticus* IMV В-7241, *Nocardia vaccinii* IMV В-7405 AND *Rhodococcus erythropolis* IMV АС-5017 in the presence of tryptophan in the culture medium // Actual environmental problems. Proceedings of the X International Scientific Conference of young scientists, master and PhD students (19-20 November 2020, Minsk, Republic of Belarus). – P. 215-216.