

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07 – КМР. 1998 “С” 2023.11.1. 015 ПЗ

КОЗЛОВОЇ СОФІЇ ОЛЕГІВНИ

2024 р.

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет (ННІ) Захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 606:632.4:577.1

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету (Директор ННІ)
Захисту рослин, біотехнологій та екології
(назва факультету (ННІ))

_____ (підпис) _____ (ПІБ)
“ ___ ” _____ 20__ р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри
Екобіотехнології та біорізноманіття
(назва кафедри)

_____ (підпис) _____ (ПІБ)
“ ___ ” _____ 20__ р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: Оптимізація умов біосинтезу циклічних ліпопептидів для захисту рослин родини *Solanaceae* проти фітопатогенів

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

Освітня програма Екологічна біотехнологія та біоенергетика
(назва)

Орієнтація освітньої програми _____
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Гарант освітньої програми

_____ (науковий ступінь та вчене звання) _____ (підпис) _____ (ПІБ)

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

_____ (науковий ступінь та вчене звання) _____ (підпис) _____ (ПІБ)

Виконав

_____ (підпис) _____ (ПІБ студента)

КИЇВ – 2024

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет (ННІ) Захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри екобіотехнології та
біорізноманіття

(науковий ступінь, вчене звання) (підпис) (ПІБ)
“ ____ ” _____ 20 ____ року

З А В Д А Н Н Я
ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ
Козлова Софія Олегівна

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма Екологічна біотехнологія та біоенергетика

(назва)

Орієнтація освітньої програми _____

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи: Оптимізація умов біосинтезу циклічних ліпопептидів для захисту рослин родини *Solanaceae* проти фітопатогенів

затверджена наказом ректора НУБіП України від “ ____ ” _____ 20 ____ р. № _____

Термін подання завершеної роботи на кафедру _____

(рік, місяць, число)

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи _____

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Пошук літературних джерел та вивчення результатів наукових досліджень даної теми
2. Підбір мікроорганізмів та поживних середовищ для проведення досліджень
3. Вивчення впливу грибного та тваринного хітозану на ріст культур бактерій та їх здатність до синтезу циклічних ліпопептидів
4. Дослідження антифунгальної активності отриманих циклічних ліпопептидів

Перелік графічного матеріалу (за потреби) _____

Дата видачі завдання “ ____ ” _____ 20 ____ р.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи _____

(підпис)

Бородай В.В.
(прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання _____

(підпис)

Козлова С.О.
(прізвище та ініціали студента)

РЕФЕРАТ

Робота виконана на 56 сторінках, містить 3 розділи, 16 рисунків, 3 таблиці, 64 використаних джерела і 1 додаток.

Мета роботи: дослідити вплив умов навколишнього середовища, а саме: складу поживного середовища та присутності у середовищі хітозану на ріст культури бактерій роду *Bacillus* та їх здатність до синтезу циклічних ліпопептидів.

Завдання:

- 1) Вивчити результати проведених досліджень на обрану тему;
- 2) Підібрати склад поживних середовищ для культивування бактерій;
- 3) Оцінити ефективність підібраних умов на ріст культури бактерій та їх здатність до синтезу циклічних ліпопептидів;
- 4) Дослідити вплив хітозану грибного та тваринного походження на здатність бактерій до синтезу циклічних ліпопептидів;
- 5) Виділити циклічні ліпопептиди та дослідити їх антифунгальну активність
- 6) Проаналізувати отримані дані.

Об'єкт дослідження: здатність бактерій роду *Bacillus* синтезувати біологічно активні речовини, які володіють антифунгальною та антибактеріальною дією.

Предмет дослідження: вплив умов навколишнього середовища на синтез бактеріями роду *Bacillus* циклічних ліпопептидів.

Актуальність теми: пошук засобів, які здатні ефективно захищати важливі сільськогосподарські культури від несприятливих умов навколишнього середовища завжди був актуальним завданням. Так, із відкриттям сполук, здатних покращити систему захисту рослин від патогенів, з'являється й необхідність з'ясувати шлях їх синтезу у великих об'ємах із мінімальними економічними витратами. У даному дослідженні було розглянуто вплив складу поживного середовища на синтез таких біологічно активних сполук, як циклічні ліпопептиди, які здатні значно сповільнювати вплив патогенних мікроорганізмів на рослину.

Ключові слова: циклічні ліпопептиди, бактерії роду *Bacillus*, оптимальні умови синтезу, фітопатогени, поживне середовище, хітозан.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	7
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1 Основні характеристики циклічних ліпопептидів	9
1.2 Функції та механізм дії циклічних ліпопептидів	12
1.3 Оптимальні умови для мікробіологічного синтезу циклічних ліпопептидів	14
1.4 Технологія промислового виробництва циклічних ліпопептидів	16
1.5 Додаткові методи впливу на синтез ліпопептидів	18
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	20
2.1 Відбір бактерій роду <i>Bacillus</i>	20
2.1.1 Ідентифікація ізолятів бактерій роду <i>Bacillus</i>	20
2.1.2 Проведення молекулярно-генетичної ідентифікації досліджуваних ізолятів.....	20
2.2 Проведення молекулярно-генетичних досліджень	21
2.2.1 Отримання кДНК.....	21
2.2.2 Проведення ПЛР у реальному часі (Real-time PCR).....	22
2.3 Дослідження впливу складу поживних середовищ на процес культивування	24
2.3.1 Приготування поживних середовищ та інокулювання культур бактерій	24
2.3.2 Використання грибного та тваринного хітозану	25
2.3.4 Модифікація поживних середовищ з додаванням хітозану	25
2.4 Методи оцінки росту бактеріальних культур, виділення та очищення циклічних ліпопептидів з антибіотичною активністю	26
2.4.1 Проведення спектрофотометрії	26
2.4.2 Виділення фракції ліпопептидних антибіотиків з культуральної рідини бактерій роду <i>Bacillus</i>	26
2.4.3 Дослідження антифунгальної активності бактеріальних екзометаболітів.....	27
2.4.4 Методи фотодокументації та статистичної обробки даних.....	27
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	28
3.1 Оптимізація складу поживних середовищ для культивування бактерій <i>Bacillus subtilis</i>	28
3.1.1 Використання стандартних поживних середовищ	30
3.1.2 Дослідження впливу хітозану на ефективність культивування	31
3.2 Антифунгальна активність бактеріальних екзометаболітів після культивування	33

3.2.1 Оцінка антифунгальної активності бактеріальних екзометаболітів після культивування досліджуваних бактерій на різних ПС.....	33
3.2.2 Оцінка антифунгальної активності бактеріальних екзометаболітів після культивування досліджуваних бактерій на ПС з різною концентрацією хітозану	35
3.3 Особливості вторинного синтезу культури бактерій під дією хітозанів різного складу і концентрацій	39
3.4 Результати проведення ПЛР у реальному часі (Real-time PCR).....	44
ВИСНОВКИ.....	47
Список використаних джерел	49
ДОДАТКИ.....	56

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

CLP – cyclic lipopeptides (циклічні ліпопептиди)

LP – lipopeptides (ліпопептиди)

LB – середовище Лаури-Бертані

КГА – картопляно-глюкозний агар

КДБ – картопляно-декстрозний бульйон

ПС – поживне середовище

ГБ – грибний хітозан

ТВ – тваринний хітозан

ВСТУП

Покращення системи захисту рослин від патогенів завжди було одним із першочергових завдань. З кожним днем, дане питання стає тільки актуальнішим, оскільки, в процесі еволюції, йде адаптація патогенних мікроорганізмів до вже існуючих засобів. Слід зазначити, що все більше уваги приділяється саме біологічним препаратам, які створюються на основі живих мікроорганізмів чи їх метаболітів, оскільки вони є більш безпечними для тварин та навколишнього середовища, більш доступними та, на відміну від хімічних, не накопичуються у навколишньому середовищі. Одними з таких речовин, синтезованих зокрема бактеріями роду *Bacillus*, є циклічні ліпопептиди.

Відомо, що дані сполуки володіють антифунгальною та антимікробною дією. Це може не лише попередити інфікування рослин, але й значно сповільнити розповсюдження патогену, і, як наслідок, розвиток хвороби в рослинному організмі.

Дослідження свідчать, що умови синтезу даних метаболітів можуть суттєво впливати не лише на їх концентрацію в отриманій культуральній рідині, але й на активність синтезу окремих сполук. Тому важливо чітко розуміти особливості впливу кожного з факторів навколишнього середовища щоб мати можливість якнайкраще застосувати їх у виробництві.

Рослини родини *Solanaceae* є економічно важливими культурами. Вони вирощуються та вживаються в їжу у багатьох країнах світу. Саме тому важливо досліджувати можливі шляхи та розробляти засоби для їх захисту. Не менш важливим є й економічний фактор, оскільки такі засоби мають бути не лише ефективними, але й доступними. Цього можна досягнути шляхом підбору умов, які будуть забезпечувати найбільший вихід продуктів синтезу при мінімальних фінансових витратах.

Таким чином, можна отримати біофунгіцид, який буде конкурувати із вже існуючими засобами і буде застосовуватись не лише в Україні, а зможе вийти на світовий ринок.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Основні характеристики циклічних ліпопептидів

Циклічні ліпопептиди є вторинними метаболітами багатьох видів бактерій та деяких видів грибів. Деякі із цих сполук часто використовуються у медицині [2], харчовій промисловості та сільському господарстві [1] через яскраво виражену антибактеріальну, противірусну, антифунгальну, протипухлинну та імуномодулюючу дії.

Основою молекули кожного циклічного ліпопептида є гідрофільний пептид та β -гідрокси або β -аміножирна кислоти з алкільними ланцюгами які формують макроциклічну структуру. Кількість амінокислот пептидного каркасу зазвичай коливається від 7 до 25, тоді як довжина жирної кислоти – від 13 до 17 атомів вуглецю [45]. Не дивлячись на високу подібність у структурі деяких сполук, їх властивості, зазвичай, досить сильно відрізняються [44].

LP належать до сімейства нерибосомальних пептидів (NRP), які, на відміну від рибосомальних пептидів (RP), синтезуються ферментами, здатними включати та згодом модифікувати як протеїногенні, так і непротеїногенні амінокислоти в олігопептид [60]. Досить часто можна спостерігати виникнення структурних аналогів деяких видів ліпопептидів, причиною цього можуть бути амінокислотні заміни, які виникають у молекулі впродовж синтезу [18]. Як наслідок, дані сполуки є дуже різноманітними та багатофункціональними.

Переважаючими продуцентами ліпопептидів на даний момент вважаються представники родів *Bacillus* і *Paenibacillus spp.* [11]. Також виявлено велику кількість ліпопептидів у *Pseudomonas spp.* [12, 13], актиноміцетів [14], *Serratia* [15] та деякі штами *Propionibacterium* [16]. Серед оомицетів, єдиним добре охарактеризованим продуцентом ліпопептидів є *Fusarium* [17]. Однак, саме представники роду *Bacillus* вважаються найбільш ефективними мікроорганізмами для великомасштабного виробництва такого типу біоактивних молекул [3, 4].

З усіх відомих циклічних ліпопептидів, найбільш активними сполуками, у контексті біологічного контролю хвороб рослин вважаються три види, а саме:

ітурин, сурфактин та фенгіцин [5]. Сурфактин, який найчастіше виробляється бактерією *Bacillus subtilis*, є основним представником ліпопептидів. Він демонструє чудові мембраноактивні властивості, що грає значну роль у його антимікробних та антифунгальних властивостях і має величезне значення у його використанні у різних галузях: медицині [6, 7], харчовій промисловості [8, 9], а також, захисті рослин [10].

Найбільш відомі та охарактеризовані такі сполуки, як: ітурин А, ітурин С, ітурин D, ітурин Е, баціломіцин D, баціломіцин F, баціломіцин L, баціломіцин Lc і мікосубтилін [4, 25, 26]. Дані сполуки часто використовуються у захисті рослин проти фітопатогенів. Найбільш ефективними є їхня дія проти таких патогенів як *Pectobacterium carotovorum subsp. Carotovorum*, *Xanthomonas campestris Cucurbitae*, *Fusarium graminearum* *Rhizoctonia solani*, тощо [27, 28].

Ітурин є ефективним антиооміцетним циклічним ліпопептидом, що вперше був виділений з бактерій *Bacillus subtilis*. Відомо також, що усі штами цього виду бактерій продукують даний ліпопептид. Він має гептапептидну частину та ланцюг β-гідроксижирної кислоти довжиною C13–C17 [42]. Він синтезуються нерибосомальними пептидними синтетазами і, оскільки існує багато сполук-гомологів ітуруну через виникнення різноманітних комбінацій амінокислот у їх складі, цей клас ліпопептидів складається з багатьох родин [51].

Ітурин має відносно малу молекулярну масу порівняно з іншими ліпопептидами, всього ~1,1 кДа. Пептидна частина ітуруну А, як правило, складається з 7 амінокислотних залишків, а гідрофобний хвіст з 11-12 вуглеців. Така структура чітко вказує на амфіфільний характер цієї сполуки, що сприяє її взаємдії з мембранами клітин [29]. Такі молекули є дуже важливими через їхні біологічні та фізико-хімічні властивості; вони можуть бути використані в фармацевтичній, нафтовій та харчовій промисловостях. Ітуриновий оперон *Bacillus sp.* має розмір 38–40 кб і складається з чотирьох відкритих рамок зчитування, а саме ItuA, ItuB, ItuC і ItuD [30].

Однією з груп циклічних ліпопептидів є й сурфактини. Вона складається з гептапептиду та C13–C15 жирного ацильного ланцюга [19]. Сурфактин, що має

молекулярну масу $\sim 1,36$ kDa, є амфіпатичним циклічним ліпогептапептидом із хіральною послідовністю LLDLLDL, з'єднаною з β -гідроксигірною кислотою з довжиною ланцюга від 12 до 16 атомів вуглецю з утворенням структури циклічного лактонного кільця [20]. Така послідовність амінокислот була виявлена у штамі AMS-H2O-1 бактерій *Bacillus sp.*

Тип сурфактину може відрізнитися залежно від послідовності зв'язування амінокислот і розміру ліпідної частини [21]. Зазвичай, ізоформи сурфактину можуть знаходитись у клітині у вигляді суміші кількох пептидних часток з різною довжиною аліфатичного ланцюга [22]. Гідрофобні амінокислоти молекули сурфактину розташовані в положеннях 2, 3, 4, 6 і 7, а залишки Glu і Asp розташовані в положеннях 1 і 5 відповідно. Варто зазначити, що структура β -гідроксигірних кислот та амінокислот залежить не лише від бактеріального штаму-продуцента, але й від типу умов культивування [20]. β -виток може бути утворений внутрішньомолекулярним водневим зв'язком, тоді як β -лист може залежати від міжмолекулярного водневого зв'язку [23].

Фенгіцин, окрім деяких штамів *Bacillus*, часто синтезується також бактеріями роду *Paenibacillus*. Він має яскраво виражену антиооміцетну активність [11], зокрема і проти нитчастих грибів [30]. Фенгіцин є біологічно активною речовиною, молекули якої є ліподекапептидами, що утворюються шляхом лактонізації [36] та містять лактонне кільце в ланцюзі β -гідроксигірної кислоти, яке може бути як насиченим, так і ненасиченим.

Молекула фенгіцину містить пептидний ланцюг з 10 амінокислот, з'єднаних з ланцюгом жирних кислот [32, 33]. 8 з 10 амінокислот пептидного ланцюга (Tyr, Thr, Glu, Ala, Pro, Gln, Tyr та Ile) беруть участь в утворенні пептидного кільця через лактонний зв'язок [36]. Ізомери фенгіцину демонструють гетерогенність у 6-му положенні пептидного фрагмента, а також різноманітність довжини ланцюга β -гідроксигірної кислоти, яка варіюється від C-14 до C-17 атомів вуглецю. Фенгіцини були класифіковані на два класи залежно від варіації однієї амінокислоти в 6-му положенні пептидного кільця.

Так, розрізняють: фенгіцин А та фенгіцин В. Фенгіцин А містить Ala в положенні 6, який у випадку фенгіцину В замінений на Val [37].

Експериментально доведено те, що фенгіцин є ідентичним до такої сполуки, як пліпастатин A1, хоча раніше вони часто розглядалися як діастереомери [31].

Суть антифунгальної активності даної речовини полягає у впливі на плазматичну мембрану клітин, що індукує збурення ліпідного подвійного шару та локальне електростатичне ремоделювання [34]. Було виявлено, що даний ліпопептид здатний пригнічувати *Rhizoctonia solani* в ризосфері бавовнику [35].

Бациломіцин відноситься до групи ітуруну, і, подібно до інших гомологів, виявляє сильну антифунгальну дію та обмежену антибактеріальну дію [47, 48]. Він є термостабільним навіть при температурі 121 °C протягом 20 хв. У своїй молекулярній структурі він містить одну β -аміножирну кислоту та сім α -амінокислот. Гомологами є бациломіцин D, F і L, які відрізняються складом амінокислот і довжиною ланцюга жирних кислот, яка може досягати від C14 до C17. Молекулярна маса $\sim 1,04$ kDa (для бациломіцину D) [50].

1.2 Функції та механізм дії циклічних ліпопептидів

Дослідження показали, що існує прямий зв'язок між структурою молекул ліпопептидів та їхніми властивостями. Зокрема, відомо, що збільшення кількості атомів вуглецю в структурі бічних ланцюгів жирних кислот посилює взаємодію з біомембранами і, як наслідок посилює антифунгальну активність цих речовин [38, 39]. Щодо модифікації пептидної частини цих біологічно активних речовин, то відомо, що заміна L-аспарагіну 1 в ітурині А L-аспарагіновою кислотою в ітурині С і етерифікація залишку тирозину 2 в ітурині А негативно впливають на їх здатність протидіяти патогенним грибам [40].

Ітурин і фенгіцин володіють сильною антифунгальною дією, що забезпечується завдяки активній їх взаємодії з клітинною стінкою грибів та як наслідок, порушують їхню структуру та функціонування [1]. Так, Wang Y. et al. показали, що ітурин А спричинив руйнування клітинної мембрани та порушення внутрішньої структури клітини патогенного гриба *Phytophthora infestans*. Крім

того, дана сполука ініціювала реакції окисного стресу, і викликала пошкодження мітохондрій: їх мембранний потенціал, активність функціонування дихального ланцюга, і зниження виробництва АТФ [45].

Сурфактин, на додаток до протівірусної, антимікоплазменної та протипротозойної дії, має широкий спектр потужної антибактеріальної дії як проти грампозитивних, так і проти грамнегативних бактерій. Як правило, бактерицидна активність ліпопептиду зростає з додаванням ліпідного фрагмента відповідної довжини (зазвичай C10–C12), а ліпопептиди, що містять вищі атоми вуглецю, такі як 14 або 16, у ліпідному хвості демонструють посилену протигрибкову активність на додаток до антибактеріальної активності [1].

Антибактеріальний механізм сурфактину забезпечується декількома шляхами. По-перше, він викликає розпад клітинної мембрани або дисбаланс осмотичного тиску; по-друге, інгібує синтез білку патогенних бактерій та запобігає розмноженню клітин. Також, він пригнічує активність бактеріальних ферментів, впливаючи на нормальний метаболізм клітин [51].

Дія баціломіцину на біомембрани заснована на стерин-фосфоліпідній залежності. Ця сполука виявляє сильновиражену антифунгальну активність *in vitro* проти широкого спектру дріжджів і патогенних грибів, зокрема і проти *Fusarium oxysporum*, а от антибактеріальна дія даної речовини є дуже слабкою. [49].

Gong et al. провели дослідження дії баціломіцину D, яке доводить, що у концентрації від 200 до 400 мкг/мл він може повністю інгібувати ріст патогенного мікроорганізму *Aspergillus flavus* (ступінь інгібування досягав 98,10%), внаслідок впливу на ріст міцелію, споруляцію та проростання спор. Основою даного ефекту є пошкодження клітинної стінки гриба, а також руйнування клітинної мембрани, гіф та спор, внаслідок чого відбувається вивільнення органел у зовнішнє середовище [46].

1.3 Оптимальні умови для мікробіологічного синтезу циклічних ліпопептидів

Основою будь-якого мікробіологічного синтезу поживне середовище, яке є субстратом для мікроорганізмів та здатне забезпечувати їх усіма необхідними поживними речовинами. У виробництві циклічних ліпопептидів можуть бути використані як синтетичні середовища, що мають визначений якісний та кількісний склад, так і натуральні.

Як показують дослідження Sun et al., під час якого проводився кількісний аналіз ітуруну, сурфактину та їх гомологів, продукованих бактеріями *Bacillus natto* NT-6, серед усіх стандартних середовищ, найбільш ефективним для виробництва ліпопептидів є середовище Ленді. Воно є синтетичним та містить у своєму складі: 10 г глюкози, 5 г L-глутамату натрію, 0,5 г MgSO₄, 0,78 г KCl, 1 г KH₂PO₄, 0,05 мг FeSO₄, 5,0 мг MnSO₄, 0,16 мг CuSO₄, 1 000 мл дистильованої води (1000 мл) та має рН 7,2. Загальний показник синтезу ліпопептидів із використанням даного середовища сягає 563,20 мг/л.

Другим за ефективністю середовище виявився картопляно-декстрозний бульйон (КДБ), що був виготовлений із 200 г картоплі, 20 г глюкози та 1000 мл дистильованої води. Показник синтезу на даному середовищі був 289,82 мг/л. Особливо ефективним дане середовище виявилось для синтезу сурфактину та його гомологів, перевищивши показники навіть для середовища Ленді [52].

Також дослідження Monteiro et. al., показали ефективність картопляно-декстрозного бульйону як середовища для культивування бактерій *Bacillus amyloliquefaciens* 629 та синтезу ними вторинних метаболітів. Серед різних протестованих культуральних середовищ (рідкий MOLP - medium optimal for lipopeptide production, MB1, бульйон Лурії-Бертані та PDB – potato dextrose broth) лише картопляний декстрозний бульйон (КДБ) дозволяв продукувати всі три ліпопептиди при 30 та 25°C, і це було єдине середовище, у якому було виявлено синтез ітуруну. Однак, у даному середовищі синтез фенгіцину та сурфактину був найнижчим, порівняно із синтезом в інших середовищах [53].

Окрім стандартних середовищ, у якості основи досить часто застосовують і відходи харчового та агропромислового комплексів. Це дозволяє оптимізувати виробництво, зменшити кількість відходів та зробити процес синтезу більш економічно вигідним. Дослідження показують, що такі середовища можуть бути не тільки доступнішими, але й досить ефективними.

Narendra Kumar et al. дослідили використання у якості компонентів для ПС 16 видів агропромислових відходів та з'ясували, що найбільш ефективним для синтезу ітуруину А є середовище із використанням відходів соняшнику отриманих під час виробництва олії. Спостерігалось 3-кратне збільшення виробництва ітуруину А за культивування при рН 6,0 і температурі 37 °С протягом 48 годин. Важливим є й той факт, що це був перший звіт про використання даного компоненту як субстрату для виробництва ітуруину А [54].

Zhang et al. вивчали оптимізацію синтезу бактеріями *Bacillus subtilis* Z-14 таких ліпопептидів як ітурин А, фенгіцин А та фенгіцин В. Оптимальними компонентами середовища у даному дослідженні були 3,85 г/л кукурудзяного борошна, 1,57 г/л соєвого шроту, 0,03 г/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 г/л $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ та 0,4 г/л $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [55].

Досить часто, компонентами ПС стають солі різних металів, іони яких також здатні активно впливати на синтез тієї чи іншої речовини.

Chen et al. у своєму дослідженні порівнювали вплив дев'яти різних іонів металів, на синтез метаболітів бактерій *B44 Bacillus atrophaeus*, зокрема і на синтез циклічних ліпопептидів, а також оцінювали й загальну антимікробну активність мікроорганізмів. Так було визначено, що такі речовини, як MnSO_4 , CaCO_3 і CuSO_4 здатні збільшувати вихід ітуруину, сурфактину та фенгіцину, MgSO_4 має нейтральний вплив, а от при обробці FeSO_4 , K_2HPO_4 , KCl , KH_2PO_4 і ZnSO_4 вихід ліпопептидів знижувався [56].

Щоб забезпечити стабільність синтезу під час культивування, важливо підтримувати на певному рівні й інші фактори навколишнього середовища – рН, температуру, швидкість струшування та ін.

Monteiro et. al. показали, що вплив температури був найбільш вираженим для сурфактину, виробництво якого збільшувалося при зниженні температури. Даний ліпопептид утворювався у більших кількостях, коли ізолят *Bacillus amyloliquefaciens* 629 вирощувався при 15°C, у порівнянні з культивуванням за температури 25 і 30 °C. Синтез фенгіцину залишався приблизно постійним при різних температурах але з більш високим показником при 25°C [53].

Також, у даному дослідженні показали важливість зміни рН середовища. Під час дослідження, рівні рН досягали показників від 5 до 9. Але найбільш оптимальними для синтезу були значення 6 та 7 [53].

Дослідження Sun et al. показало значний вплив і швидкості струшування середовища під час культивування оскільки цей процес дозволяє підвищити вміст розчиненого кисню у культуральній рідині [57]. Так, збільшення швидкості струшування збільшувало концентрацію ліпопептидів до максимальної концентрації 659,00 мг/л при 200 об/хв. Зокрема, концентрація гомологів ітуруну зростала постійно зі швидкістю і досягла максимального значення за швидкості струшування 160 об/хв, однак подальше збільшення швидкості сповільнювало синтез даних сполук. Виробництво сурфактину було приблизно на одному рівні при струшуванні зі швидкістю 120-160 об/хв, однак при більших швидкостях (> 160 об/хв), синтез ставав активнішим [52].

Під час промислового виробництва високої концентрації розчиненого кисню можна досягти шляхом збільшення потоку повітря та швидкості перемішування у ферментері, однак дані процеси потребують більш детального вивчення та вдосконалення.

1.4 Технологія промислового виробництва циклічних ліпопептидів

Biniarz et al. показали процес виробництва псевдофактинів (PFs) – сполук із сімейства циклічних ліпопептидів, що здатен синтезуватись арктичним ізолятом *Pseudomonas fluorescens* BD5 (Janek et al., 2010). Дане дослідження проводилось з метою оптимізації умов культивування та постферментаційних процесів для отримання високих концентрацій цільової речовини у

культуральній рідині та подальшого відокремлення індивідуальних сполук. Важливо зазначити, що дані методи можуть бути застосовані для виробництва та очищення будь-яких CLP, які були синтезовані бактеріями *Pseudomonas* або *Bacillus*.

Вченим вдалося встановити ефективне культивування *P. fluorescens* BD5 у біореакторах з робочими об'ємами в 2,5 л, а потім і у 30 л (Biniarz et al., 2018). Також було продемонстровано ефективний процес очищення цільових речовин (PF) з піни, зібраної з поверхні культуральної рідини, разом з очищенням і розділенням структурних аналогів.

Першим етапом є активація культур бактерій, що є обов'язковим після тривалого зберігання культур. Після одностоденної інкубації, було відібрано поодинокі колонії та інокульовано їх на середовище Лаури-Бертані (LB) та інкубовано протягом ночі при 28 °C та струшуванні 180 об/хв. На другому етапі, бактерії перенесли в 300 мл колби Ерленмейера, наповнених 100 мл середовища Кінга (KB). Ці два етапи об'єднуються в один – етап прекультивування, під час якого культуру доводять до початкової оптичної щільності 0,1.

Наступний етап лабораторного культивування проводять у біореакторі в 2,5 л середовища зі швидкістю перемішування 300 об/хв, швидкістю аерації 3 л/хв та рН на рівні $7,0 \pm 0,1$. Під час культивування проводилось постійне вимірювання оптичної щільності культуральної рідини та концентрації синтезованого цільового продукту. Постійно проводився моніторинг температури, рівня рН та розчиненого кисню (pO₂).

Для промислового культивування, використовуються технічні біореактори об'ємом 42 літри. Аналогічно лабораторному, у середовище об'ємом 30 літрів, після його автоклавовання при 121 °C протягом 20 хв, вноситься прекультура бактерій. Проводиться постійний моніторинг умов: швидкість перемішування – 300 об/хв, швидкість аерації на 30 л/хв, рН $7,0 \pm 0,1$ [58].

Одним із факторів застосування циклічних ліпопептидів, є висока вартість виробництва, спричинена зокрема і складністю очищення. Така складність часто викликана надмірним синтезом інших ліпопептидів та їх гомологів [42].

Під час процесу екстрагування використовується піна, отримана в процесі культивування і зібрана у зовнішньому резервуарі. Піну центрифугують (15000×g, 30 хв, 4 °C) і розділяють на дві фракції: clear supernatant (SUP) та wet cell pellet (CELL). Обидві фракції використовують для виділення PF.

Для клітинної фракції (CELL), відбирали 40 г (з 500 г зібраної піни) промивали за допомогою 50 мл деіонізованої води, а потім тричі екстрагували із використанням 50 мл ацетонітрилу (30 хв, 180 об/хв, 28 °C). Після кожного етапу зразки центрифугували (15000×g, 30 хв, 4 °C).

Для 500 мл фракції супернатанту (SUP) його відбирали і нагрівали на водяній бані протягом 15, 30 або 60 хв, а потім охолоджували та центрифугували (15000 ×g, 30 хв, 4 °C). Супернатанти збирали та осаджували, промивали 10 мл деіонізованої води з подальшою потрійною екстракцією з використанням 50 мл метанолу, етанолу, ацетонітрилу або етилацетату (30 хв, 180 об/хв, 28 °C). Зразки центрифугували (15000×g, 30 хв, 4 °C) [58].

1.5 Додаткові методи впливу на синтез ліпопептидів

Методи генетичної інженерії усе частіше застосовуються для оптимізації виробництва у різних галузях. Так, для виробництва циклічних ліпопептидів, важливим є не тільки підбір штаму продуцента, але й особливості його метаболізму. Вибрані штами можливо модифікувати за допомогою традиційних методів, наприклад, гомологічної рекомбінації або технологій на основі CRISPR-Cas9 наступного покоління для збільшення виробництва цільових LP шляхом введення генів, які сприяють виробленню LP, видалення генів, які пригнічують біосинтез LP, або стимулювання надмірної експресії генів [60].

Залежно від мети, генетичні регуляції можуть бути простими та включати одногенні або більш складними – багатогенні видалення та/або вставки [61]. Так, метаболічну інженерію можна використовувати для збільшення виробництва LP за допомогою штучних промоторів для збільшення кількості копій генів біосинтезу та/або регуляторів або, альтернативно, за допомогою індукованих промоторів для надмірної експресії цілих кластерів генів. Дані методи регуляції

дають змогу не лише збільшити титр синтезованих цільових речовин, але й змінювати структуру ліпопептидів, впливаючи на їх функції [62].

Окрім цього, взявши до уваги особливості взаємодії бактерій роду *Bacillus* із грибами, а саме їх здатність стимулювати синтез вторинних метаболітів, вчені почали розглядати можливість використання хітозану у поживних середовищах. Так, Kang et al. у своєму дослідженні використовували різні форми хітозану (0,5 % порошку, 0,1 % розчинного та 0,15 % колоїдного) у якості джерел вуглецю під час культивування бактерій штаму *Bacillus amyloliquefaciens* PPL. Ферментація на колоїдному субстраті з 0,15% концентрацією хітозану продемонструвала збільшення утворення біоплівки бактеріями та найвищий ступінь інгібування проростання спор фітопатогенних грибів, що спричиняють фузаріозного в'янення томатів (79,5 %) та ефективність біоконтролю (76,0 %) у томатах. Колоїдна культура посилювала експресію гена хітозанази (у 5,9 разів), та синтез речовини, пов'язаної з експресією генів циклічних ліпопептидів (у 2,5–5,7 разів). Крім того, три культури хітозану індукували морфологічні зміни *Fusarium oxysporum*. Ці результати свідчать про те, що використання хітозану є перспективним та потребує подальшого вивчення [63].

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Відбір бактерій роду *Bacillus*

2.1.1 Ідентифікація ізолятів бактерій роду *Bacillus*

Було отримано фрагменти послідовностей гена 16S рРНК рiстстимулюючого штаму бактерій роду *Bacillus* розміром 1456 п.н., для проведення секвенування. В результаті, було виявлено 99,73% схожості з *Bacillus subtilis* BSFHB.

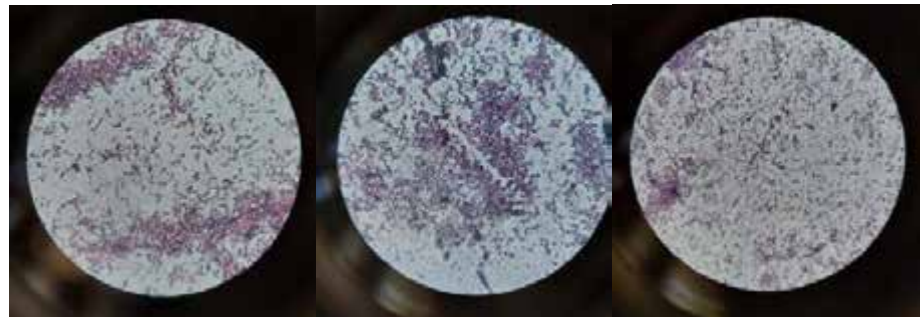


Рис. 2.1 Результати фарбування за грамом зразків досліджуваних бактерій

Bacillus – паличкоподібний, грам-позитивний рід бактерій, які можуть бути як облігатними, так і факультативними аеробами, позитивні за ферментацією каталази, можуть бути вільноживучими або патогенними.

Bacillus subtilis – є одним із найбільш вивчених видів бактерій, який є важливим у галузі біотехнології та захисту рослин через їх здатність до синтезу ряду біологічно активних сполук. Дані бактерії мають геном довжиною 4188 п.н. та здатні утворювати ендоспори що робить їх також корисною моделлю для дослідження основних метаболічних процесів та процесів клітинної диференціації.

2.1.2 Проведення молекулярно-генетичної ідентифікації досліджуваних ізолятів

Бактерії вирощувались на картопляно-глюкозному агарі (КГА) при контрольованих умовах (температура, освітлення та ін.). Після інкубації впродовж 48 годин, бактерії відбирались та використовувались для приготування

суспензії. Для виділення ДНК, було використано набір GeneJet Genomic DNA Purification Kit (ThermoScientific), та алгоритм, наведений у інструкції.

Ампліфікацію гена 16S рРНК було проведено із використанням таких праймерів: 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') та 1492r (5'-CGGTTACCTTGTTCAGACTT-3'), ПЛР-суміші, об'ємом 25 мкл, яка містила 12,5 мкл 2x DreamTaq PCR Master Mix (ThermoScientific), 30 пкмоль кожного праймера та 50 нг ДНК та використання даного протоколу: початкова денатурація за температури 95 °С протягом 2 хв.; в подальшому, 30 циклів – 95 °С протягом 30 сек. кожний; 55 °С, 45 сек.; 72 °С протягом 90 сек; та кінцева елонгація при 72 °С впродовж 7 хв. Було використано ампліфікатор Mastercycler Personal 5332 (Eppendorf, Німеччина).

Продукти ПЛР розділяли у 1,7% агарозному гелі, із 0,01% вмістом бромистого етидію, з подальшою візуалізацією в УФ-світлі. Було отримано амплікон розміром ~ 1500 п.н., який вирізали з гелю і очищали за допомогою набору GeneJet PCR Purification Kit (ThermoScientific). За допомогою однопроменевого спектрофотометра VS Optizen POP (Південна Корея) було визначено концентрацію отриманої ДНК. Сиквенування у двох напрямках проводили на приладі Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, США) з використанням набору реактивів "BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit".

Було також проведено порівняння отриманої нуклеотидної послідовності з наявними у базі даних GenBank за допомогою програми NCBI Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

2.2 Проведення молекулярно-генетичних досліджень

2.2.1 Отримання кДНК

Для проведення молекулярно-генетичних досліджень із застосуванням полімеразно-ланцюгової реакції, необхідно виділити РНК з досліджуваних мікроорганізмів та в подальшому синтезувати кДНК. Для цього використали 100 мл попередньо підготованого суспензійного розчину бактерій та набір для екстракції нуклеїнових кислот RIBO-sorb.

Виділену РНК було оброблено ферментом ДНК-азою для видалення можливих послідовностей ДНК в отриманому зразку. В подальшому було отримано розчин, який містив 10 мкл РНК, 1 мкл ДНКазу I, 2 мкл 10х реакційного буфера і 7 мкл DEPC деіонізованої води. Даний розчин було інкубовано протягом 1 години при 37 °С.

Для запобігання взаємодії ДНК-азу з синтезованими під час ампліфікації послідовностями, необхідно було провести інактивацію даного ферменту за допомогою 2 мкл 0,5 М EDTA і нагріванням суміші до 65 °С протягом 15 хв.

Для отримання кДНК, було проведено зворотну транскрипцію із використанням реагентів RevertAid і First Strand cDNA Synthesis Kit Random від Hexamer Primer (Thermo Fisher Scientific, США) та наданим в інструкції алгоритмом дій. Так, зразок об'ємом 20 мкл витримували при температурі 42 °С протягом 60 хв. Отримані зразки кДНК зберігали при -20 °С не більше трьох діб.

2.2.2 Проведення ПЛР у реальному часі (Real-time PCR)

Для оцінки здатності відібраних бактерій синтезувати досліджувані циклічні ліпопептиди, було проведено полімеразно-ланцюгову реакцію із використанням праймерів, які дають змогу ідентифікувати гени синтезу ітуруну (ItuA), фенгіцину (FenD), бациломіцину (BamC) та сурфактину (S1).

Праймери Було розроблено за допомогою платформи GeneRunner (Hastings Software) та програмного забезпечення PRIMER3 (табл. 2.1).

Нуклеотидні послідовності праймерів, використаних для визначення рівня експресії генів циклічних ліпопептидів

№ п/п	Ген	Сиквенс 5'→3'	№ Genbank	Розмір продукту, пн	t відпалу, °C
<i>B. subtilis</i> BSFHB					
1	Сурфактин	S1-F: CCGCACCAAAAG AAGAACGG	AP028964.1	182	58
		S1-R: GCTCGCCCTTCCT AGACTTC			
2	Бациломіцин	BamC-F: GGATGGAAGCAA TCAACCGC	CP076408.1	150	60
		BamC-R: AAGTCCGTGATG ATGCCGTT			
3	Фенгицин	FenD-F: ATGGGAAATGTT CGGAGCGT	CP054584.1	220	60
		FenD-R: CTGTAAAGCTTCT CCGCCGA			
4	Ітурин А	ItuA-F: AAGACGCCATTG CCACTGTA	EU263005.1	187	60
		ItuA-R: CGAGTTCCTCCGC TCTGATC			

ПЛР у реальному часі (Real-time PCR) проводили із використанням ампліфікатора CFX96 (BioRad, США) та готової суміші Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США). Протокол ПЛР

включав: 95 °С протягом 10 хв, 40 циклів: 95 °С – 10 с, 58 °С – 15 с (ідентифікація сигналу) і 72 °С – 30 с. Кожен зразок реакційної суміші був об'ємом 20 мкл та складався з 10 мкл 2x Master Mix, 200 нг кДНК, 0,3–0,5 мкМ прямого та зворотного праймерів. В подальшому було розраховано відносну експресію досліджуваних генів (RQ) за допомогою методу 2- $\Delta\Delta C_t$ (Livak et al., 2001).

2.3 Дослідження впливу складу поживних середовищ на процес культивування

2.3.1 Приготування поживних середовищ та інокулювання культур бактерій

Одним із завдань даного дослідження було порівняти ефективність трьох різних ПС для культивування бактерій роду *Bacillus* та їх здатність синтезувати ліпопептидні антибіотики. Відбір середовищ відбувався на основі огляду літератури та результатів сучасних досліджень. Таким чином, було обрано 3 найбільш ефективні та найбільш поширені ПС: напівсинтетичне середовище Звягінцева, синтетичне – Ленді та натуральне – КДБ (Картопляно-декстрозний бульйон).

Картопляно-декстрозний бульйон містить:

картоплю – 200 г;

глюкозу – 20 г та

дистильовану воду – 1000 мл

Середовище Звягінцева містило:

пептон – 5 г

глюкозу – 5 г

дріжджовий екстракт – 3 г

K_2HPO_4 – 0,2 г

дистильовану воду – 1000 мл

Середовище Ленді містило:

глюкозу – 10 г

L-глутамату натрію – 5 г

MgSO₄ – 0,5 г

KCl – 0,78

KH₂PO₄ – 1,0 г

FeSO₄ – 0,05 мг

MnSO₄ – 5,0 мг

CuSO₄ – 0,16 мг

дистильовану воду – 1000 мл

Приготовані рідкі ПС мали рН 7-7,2. Їх розливали у колби Ерленмейєра об'ємом 100 мл, по 50 мл у кожную. Колби закривали та автоклавували при надлишковому тиску 0,11 МПа і температурі 120 °С протягом 45 хв. Середовища охолоджували до кімнатної температури, після чого у кожную колбу в асептичних умовах вносили культуру бактерій. Культивування проводилось за температури 25 °С на шейкері при постійному перемішуванні зі швидкістю 150 об/хв.

2.3.2 Використання грибного та тваринного хітозану

Було взято грибний хітозан у формі порошку виробника Healthdream Biological Technology Co., Ltd., зі ступенем деацетилювання 90% отриманий з грибів *Pleurotus ostreatus* та *Agaricus bisporus*. Молекулярна маса 250-300 кда.

Тваринний хітозан у формі порошку грубого помелу виробника Sigma-Aldrich зі ступенем деацетилювання 75%, отриманий з раовин ракоподібних. Молекулярна маса 310-375 кда.

2.3.4 Модифікація поживних середовищ з додаванням хітозану

Було приготовано чотири поживні середовища із різними концентраціями хітозану грибного та тваринного походження: 1:100, 1:1000; 1:10 000 та 1:100 000, а також контрольне середовище без додавання хітозану. Для цього, у перші три колби із ПС Звягінцева додавали готовий розчин грибного хітозану, а у інші три – розчин тваринного хітозану. Після цього, усі колби закривали та автоклавували при надлишковому тиску 0,11 МПа і температурі 120 °С протягом 45 хв для запобігання контамінації. Стерильне середовище інокулювали

культурами досліджуваних бактерій та інкубували у термостаті при 25 °С. Протягом 4 діб, з інтервалом у 24 години, робили заміри росту грибного міцелію.

2.4 Методи оцінки росту бактеріальних культур, виділення та очищення циклічних ліпопептидів з антибіотичною активністю

2.4.1 Проведення спектрофотометрії

Для дослідження концентрації розчинів та титру бактеріальних клітин у культуральній рідині, було використано однопроменевий спектрофотометр VS Optizen POP (Південна Корея). У кювети об'ємом 2,5 мл вносили 1000 мкл культуральної рідини. Оптичну густину вимірювали за довжиною хвилі 600 нм. Вимірювання проводили в 3-х кратній повторності на першу та третю добу.

2.4.2 Виділення фракції ліпопептидних антибіотиків з культуральної рідини бактерій роду *Bacillus*

Для екстракції екзометаболітів за даним протоколом, необхідна мінімальна кількість культуральної рідини 100 мл [64].

1. Відібрати культуральну рідину та відокремити її від біомаси бактерій за допомогою центрифугування при 8000 об/хв протягом 30 хв.

2. Відібрати надосадову рідину та пропустити її через шприцевий мембранний фільтр з діаметром пор 0,2 мкм з метою видалення залишків клітин.

3. До отриманого фільтрату додати HCl_{conc} до та довести його до рН 0,2, після чого залишити для формування осаду на 18-24 год при 4 °С.

4. Відібрати осад відділивши його від супернатанту за допомогою центрифугування при 8000 об/хв протягом 30 хв, після чого злити супернатант.

5. До сухого залишку додати 80% водний розчин метанолу із розрахунку 8 об'ємів розчину до 1 об'єму осаду, суспендувати, після чого залишити на 30 хв за кімнатної температури, періодично перемішуючи.

6. Суміш центрифугувати при 8000 об/хв протягом 15 хв, після чого, супернатант відібрати в окрему ємність. Даний процес екстрагування повторити ще двічі та об'єднати отримані метанольні фракції.

7. Метанольний екстракт екзометаболітів упарити досуха (за температури не вище 55 °С).
8. Сухий залишок промити невеликою кількістю етилацетату.
9. Промити сухий залишок невеликою кількістю ацетону.
10. Отриманий сухий залишок перерозчинити у 80% водному розчині метанолу.

Отриманий розчин є грубим екстрактом ліпопептидних антибіотичних сполук, який може бути використаний для подальшої очистки або досліджень.

2.4.3 Дослідження антифунгальної активності бактеріальних екзометаболітів.

У чашки Петрі, на поживне середовище КГА інокулювали культуру грибів *Fusarium oxysporum* та інкубували протягом 24 годин. Після цього, у середовищі на відстані 3,5 см від центру культури гриба робили лунки, у які вводили по 20 мкл виділеної з культуральної рідини бактерій роду *Bacillus* фракції ліпопептидних антибіотиків. Чашки інкубували у термостаті при 25 °С. Протягом 4 діб, з інтервалом у 24 години, робили заміри росту грибного міцелію.

2.4.4 Методи фотодокументації та статистичної обробки даних

Для визначення антифунгальної активності бактеріальних метаболітів чашки Петрі впродовж культивування фотографували з інтервалом у 24 год. Отримані фото опрацьовувались за допомогою програми Image Pro-Premier 10.0.15 для отримання загальної площі грибного міцелію, його щільності, що допомогло оцінити антифунгальну активність екзометаболітів, розміщених у лунках.

Результати вимірювань було опрацьовано у програмі Microsoft Excel та представлено як середнє значення \pm стандартна похибка ($x \pm SE$).

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Оптимізація складу поживних середовищ для культивування бактерій *Bacillus subtilis*

Вибір оптимального поживного середовища для біотехнології отримання ліпопептидів в процесі культивування *Bacillus subtilis* BSFHB є складним завданням, яке вимагає комплексного підходу. Необхідно враховувати як амінокислотний склад середовища, так і специфічні вимоги штамму. Поєднання кластерного і кореляційного аналізів у підборі поживних середовищ з оптимальним складом дозволяє отримувати прогностичні переваги перед емпіричним підходом. Результати такого аналізу для штучних, синтетичних і напівсинтетичних поживних середовищ представлені на тепловій карті (рис. 3.1).

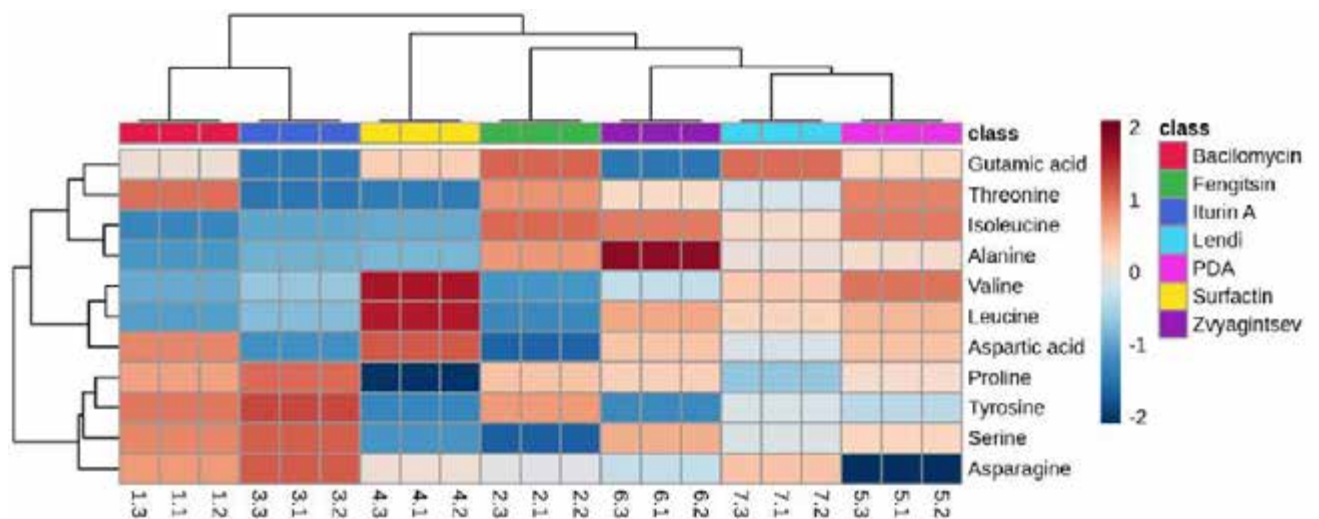


Рис. 3.1 Теплова карта наближеності комплексу амінокислот, що входять до складу поживних середовищ і циклічних ліпопептидів бактерій

Теплова карта надає візуальне уявлення про те, як співвідношення різних амінокислот варіюється в різних типах ліпопептидів і поживних середовищах. Вона відображає кількісні показники кожної амінокислоти у різних зразках. Тепліші кольори вказують на більш високий вміст амінокислот, а холодніші – на нижчий. Дендрограми зліва та зверху розподіляють по кластерам зразки та амінокислоти згруповані на основі їх подібності. Це дозволяє виявити групи

ліпопептидів зі схожим амінокислотним складом, а також групи амінокислот, які найчастіше містяться разом.

До складу ПС Звягінцева входить пептон та дріжджовий екстракт. Обидва компоненти багаті на замінні та незамінні амінокислоти. Перевага цього ПС полягає в органічному складі і наявності окрім амінокислот комплексу вітамінів, мікроелементів та інших важливих для бактерій хімічних сполук. Це середовище відомо своєю універсальністю. Воно забезпечує збалансоване живлення багатьох видів бактерій, сприяє росту їхньої біомаси та синтезу широкого спектру ферментів. Водночас для синтезу ліпопептидів це може мати певні недоліки, оскільки збагаченість ПС гідролізатами білків і пептидами може пригнічувати синтез ліпопептидів.

На відміну від ПС Звягінцева середовище Ленді являється повністю синтетичним. До його складу не входять амінокислоти як такі. В якості джерела азоту воно містить значну кількість глутамату натрію, що може стимулювати синтез фенгіцинів, які містять глутамінову кислоту і вважаються активними по відношенню до грибів. Утім, відсутність амінокислот може обмежувати ріст бактерій та негативно впливати на синтез інших типів ліпопептидів.

ПС КДБ містить амінокислоти, які характерні для бульб картоплі. Їхній склад і співвідношення може варіювати залежно від сорту культури, а також умов вирощування, що здатен негативно впливати на відтворюваність біотехнологічного процесу. Перевагою КДБ перед синтетичними середовищами є природний для росту багатьох ендоефітних бактерій органічний склад. Узагальнення переваг і недоліків кожного з проаналізованих поживних середовищ представлено у таблиці 3.1.

Отже, ПС Звягінцева може бути оптимальним для початкових стадій культивування бактерій та нагромадження загальної біомаси. Середовище Ленді представляється ефективним для стимуляції синтезу фенгіцинів, які містять глутамінову кислоту.

**Аналіз потенційної забезпеченості поживних середовищ амінокислотами
для біосинтезу циклічних ліпопептидів**

ПС	Основні джерела азоту	Потенційний вплив ПС на синтез ліпопептидів	
		переваги	недоліки
Звягінцева	Пептон, дріжджовий екстракт	Збалансований амінокислотний склад, стимулює ріст і синтез білка. Може містити амінокислоти, необхідні для синтезу різних ліпопептидів (аргінін, лейцин, валін тощо).	Містить значну кількість білкових компонентів та гідролізатів, що можуть пригнічувати синтез ліпопептидів.
Ленді	Глутамат натрію	Високий вміст глутамату може стимулювати синтез ліпопептидів, особливо фенгіцинів, що містять глутамінову кислоту.	Збіднений амінокислотний склад може уповільнювати синтез ліпопептидів, які не містять глутамінову кислоту. Може бути недостатнім для активного росту бактерій.
КДБ	Екстракт картоплі	Містить широкий спектр амінокислот, включаючи аспарагінову та глутамінову кислоти. Може бути природним середовищем для росту багатьох бактерій.	Склад може варіювати залежно від сорту картоплі. Може бути недостатньо збалансованим для оптимального синтезу ліпопептидів.

Однак, для отримання максимальної кількості біомаси та різноманітних ліпопептидів воно може бути недостатнім і потребує додаткової модифікації. ПС КДБ є прийнятним для культивування штамів, які адаптовані до рослинних субстратів і відносяться до групи облігатних ендофітів.

3.1.1 Використання стандартних поживних середовищ

За даними спектрофотометричного аналізу культуральної рідини найвища концентрація бактеріальних клітин, як на першу, так і на третю добу культивування була визначена на ПС Звягінцева (абсорбція світла (АБС) 1,90 та 1,69 у.о. відповідно). Дещо меншим за концентрацією бактеріальних клітин було ПС Ленді, де середні показники АБС були 0,04 та 1,43 на першу та на четверту добу відповідно. Найнижчими показники були для ПС КДБ – 0,40 та 0,21 у.о. відповідно (рис. 3.2).

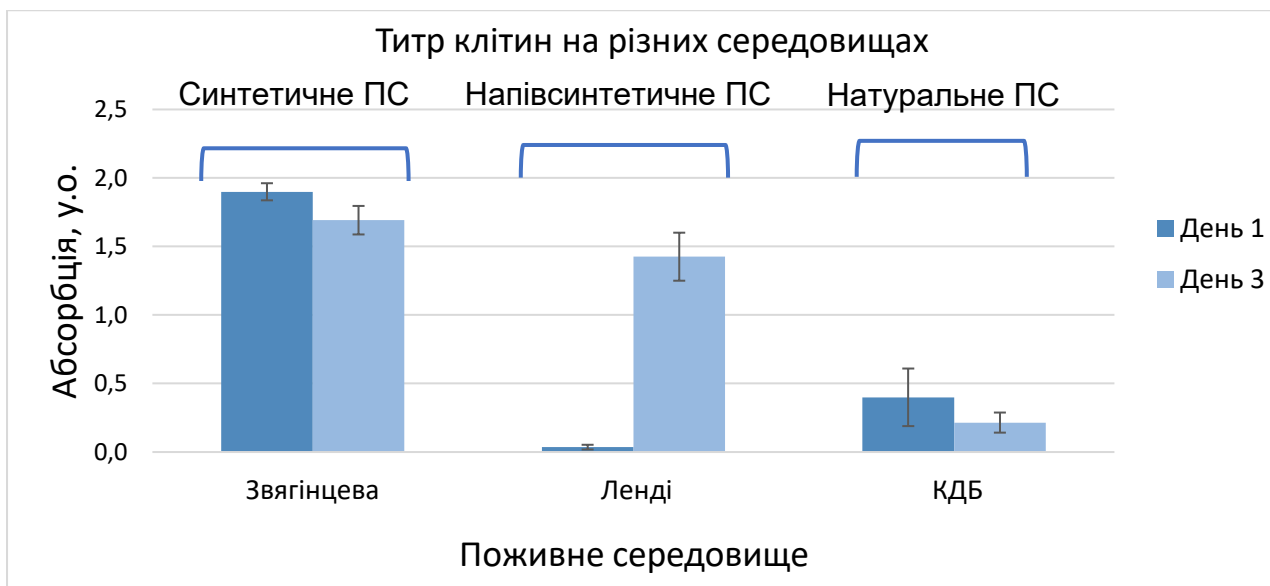


Рис. 3.2 Титр бактеріальних клітин за культивування на різних поживних середовищах

Різницю у концентрації бактеріальних клітин можна пояснити різним складом PS та можливою нестачею кількості поживних речовин та мікроелементів у натуральному середовищі КДБ. Окрім цього, на графіку видно, що для середовища Звягінцева та КДБ характерний швидкий початок росту бактеріальних культур, тобто на даних середовищах фаза експоненціального росту ймовірно настала раніше, ніж із використанням середовища Ленді. Для більш точного висновку потрібні темпоральні вимірювання протягом трьох діб.

3.1.2 Дослідження впливу хітозану на ефективність культивування

Оскільки на попередньому етапі найкращі результати культивування було отримано саме із застосуванням PS Звягінцева, в подальшому, дослідження проводились із його використанням.

На даному етапі, важливим було не лише оцінити здатність хітозану впливати на ріст культури бактерій, але й визначити його вплив на синтез бактеріальними клітинами біологічно активних сполук, які володіють антифунгальною активністю за різних концентрацій (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Такий підхід дозволяє врахувати описаний в науковій літературі ефект бактеріостатичної дії розчинів хітозану з високою молекулярною масою. Високі концентрації хітозану у складі PS здатні не тільки впливати на бактеріальні

клітини безпосередньо, на їх поділ та метаболізм, але й взаємодіяти з солями металів, які входять до складу ПС. Таким чином, передбачалось, що за умов низьких (10^{-3} , 10^{-4}) та наднизьких (10^{-5}) концентрацій хітозан не буде суттєво впливати на доступність макроелементів для живих клітин але при цьому буде здатний виконувати функцію еліситора і викликати у бактерій захисну реакцію через активний синтез циклічних ліпопептидів з антифунгальною активністю.

Спектрофотометричний аналіз показав, що на третю добу, порівняно з першою добою культивування, спостерігається тенденція до збільшення кількості бактеріальних клітин. Варто зауважити, що передбачуваним виявилось значне зростання колонії *Bacillus subtilis* у поживних середовищах з найменшою концентрацією ГБ хітозану, порівняно з контролем, різниця між першою і третьою добою культивування зростає на 0,7 та 1,0 відповідно.

За умов збільшення концентрації ГБ хітозану 10^{-4} та 10^{-3} різниця між першою та третьою добою була найменшою, що підтверджує бактеріостатичні властивості хітозану. На основі отриманих даних було побудовано гістограму (рис. 3.3), з якої видно, що найбільша кількість бактеріальних клітин на першу добу культивування спостерігалась для ПС із концентрацією хітозану 10^{-4} та 10^{-3} , однак на третю добу найбільша кількість бактеріальних клітин була для ПС із концентрацією хітозану 10^{-5} .



Рис. 3.3 Титр бактеріальних клітин за культивування на поживних середовищах з різною концентрацією хітозану.

Таким чином, оптимальною концентрацією хітозану для нарощування біомаси культури бактерій *Bacillus subtilis* BSFHB є 10^{-5} . Водночас, варто зауважити, що кількісні показники концентрації клітин не є визначальними у виявленні антифунгальної активності культуральної рідини, яка залежить зокрема від наявності циклічних ліпопептидів, таких як фунгіцин, ітурин, бациломіцин та сурфактин. Для перевірки антифунгальної дії потрібно проведення прямого впливу очищеної культуральної рідини, а також очищених ліпофільних продуктів на тест-об'єктах (наприклад, фітопатогенних мікроміцетах).

3.2 Антифунгальна активність бактеріальних екзометаболітів після культивування

3.2.1 Оцінка антифунгальної активності бактеріальних екзометаболітів після культивування досліджуваних бактерій на різних ПС

Для визначення здатності *Bacillus subtilis* BSFHB до синтезу екзометаболітів з антифунгальною дією спочатку проводились експерименти із впливу стандартного складу ПС без додавання хітозанів. Після спеціальної

обробки і очищення культуральної рідини з *Bacillus subtilis* BSFHB (в контрольних зразках) відповідні ліпофільні продукти були використані в якості тест-зразків з потенційною антифунгальною активністю. У дослідженнях використовували чисті культури *Fusarium oxysporum*. За результатами експерименту встановлено, що найбільша площа грибного міцелію спостерігалась на чашках із додаванням метаболітів, виділених із середовища Звягінцева, а найменша – із середовища КДБ (рис. 3.4).

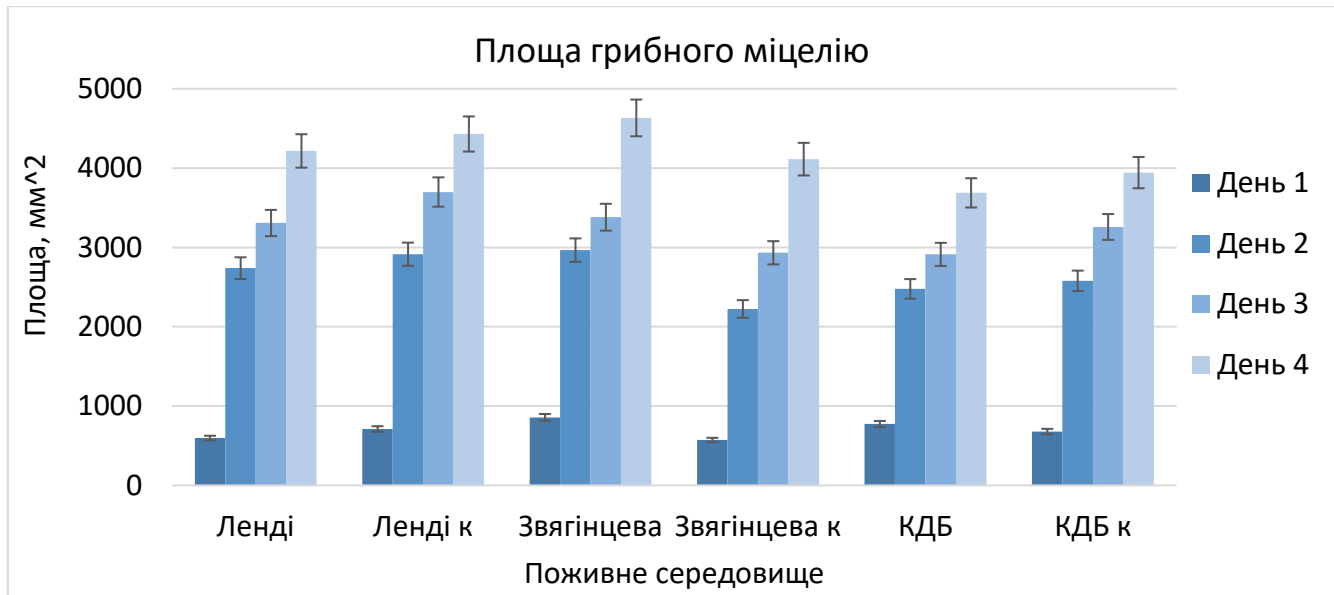


Рис. 3.4 Площа грибного міцелію із додаванням метаболітів, виділених з культуральної рідини бактерій роду *Bacillus* із використанням різних за складом ПС: Ленді, Звягінцева та КДБ. Як контрольні зразки (к) використовувались чисті ПС без бактерій.

Однак, на чашках із використанням метаболітів, виділених із середовищ Звягінцева та Ленді було видно значну антифунгальну активність, яка характеризувалась повним пригніченням росту грибного міцелію на ділянках навколо лунок з препаратом, на відміну від метаболітів, отриманих із використанням середовища КДБ, де міцелій активно ріс навіть на самих лунках (рис. 3.5).

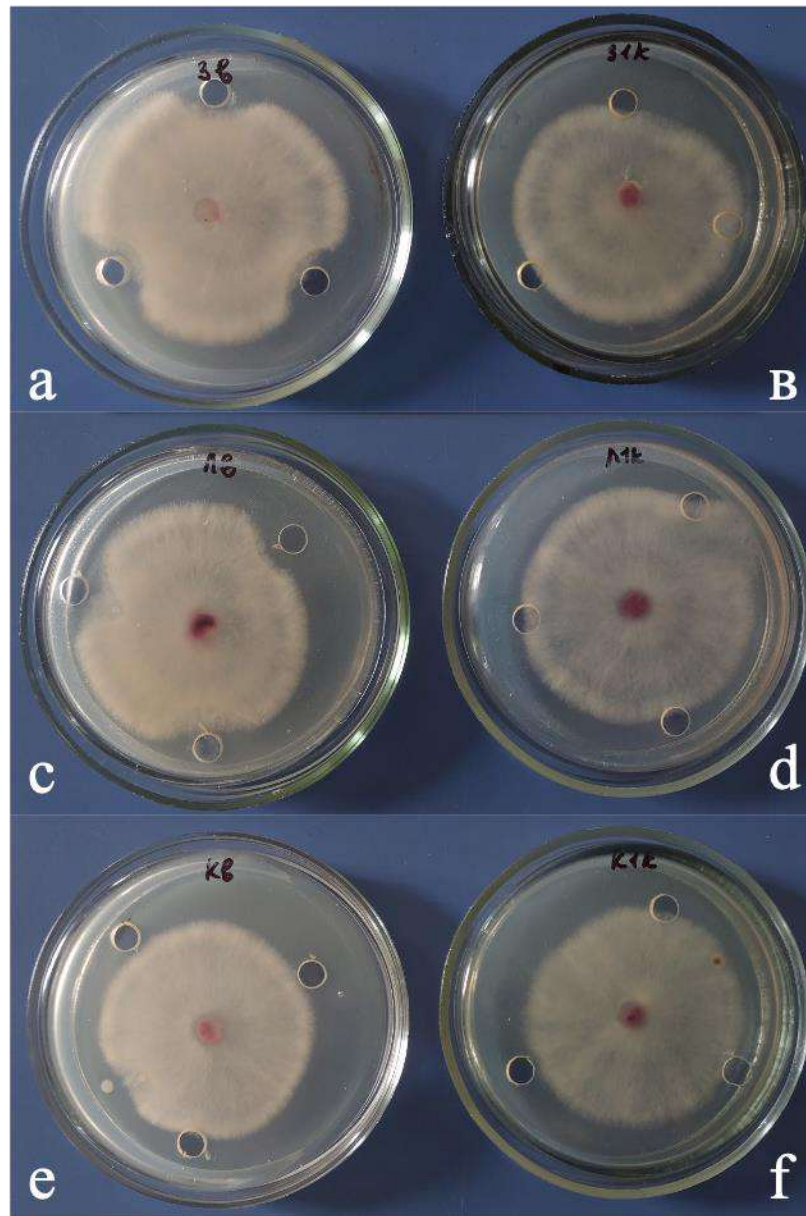


Рис. 3.5 Оцінка антифунгальної активності екзометаболітів бактерій *Bacillus subtilis* BSHB, які були виділені з різних ПС: а – середовище Звягінцева, с – середовище Ленді, е – середовище КДБ. В якості контролю використовувались ПС без додавання культури бактерій (b, d, f).

3.2.2 Оцінка антифунгальної активності бактеріальних екзометаболітів після культивування досліджуваних бактерій на ПС з різною концентрацією хітозану

Для дослідження впливу бактеріальних екзометаболітів на ріст міцелію *Fusarium oxysporum* очищені розчини об'ємом 50 мкл додавали у лунки. Вимірювання площі міцелію виконували на першу, третю та четверту добу

культивування. Найменшою площа грибного міцелію була на чашках Петрі із додаванням метаболітів, виділених із бактерій, які були вирощені на середовищі із концентрацією ГБ хітозану 10^{-3} , а найвищою – із концентрацією 10^{-2} (рис. 3.6).

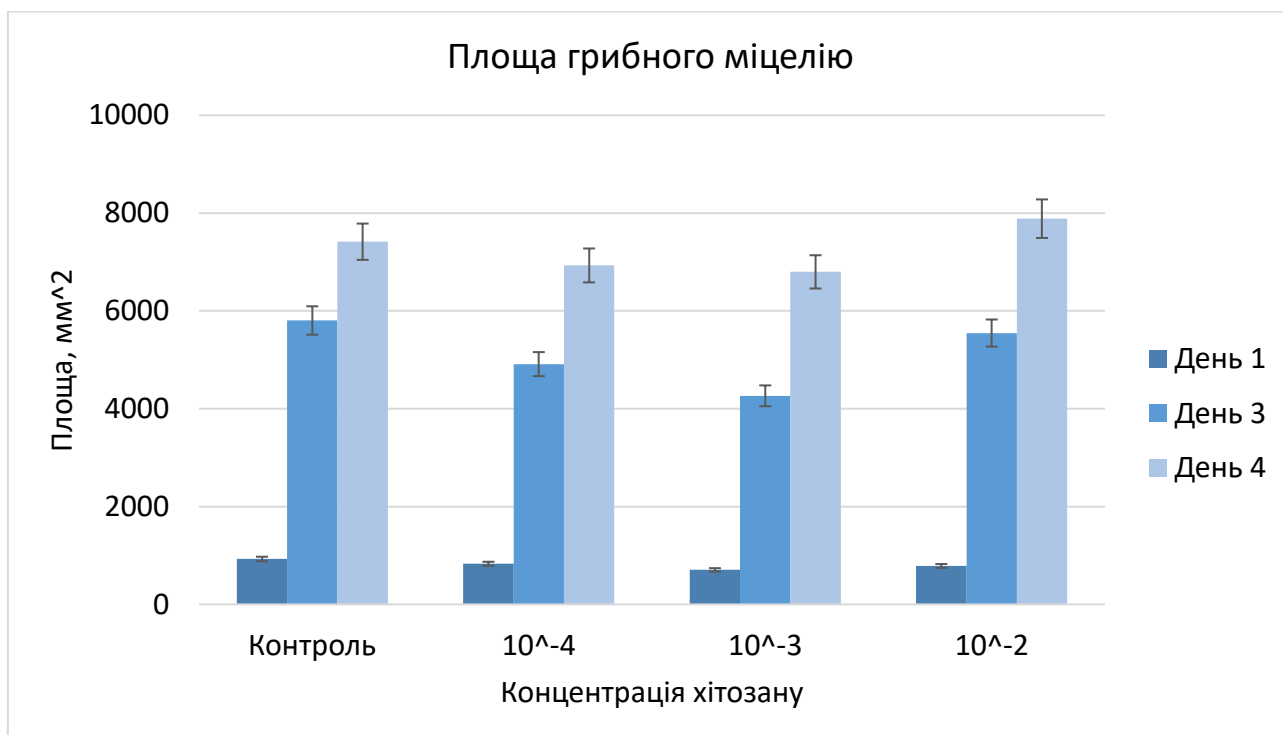


Рис. 3.6 Площа грибного міцелію із додаванням метаболітів, виділених з культуральної рідини бактерій роду *Bacillus* із використанням різних концентрацій ГБ хітозану

Отримані дані вказують на те, що ГБ хітозан у концентрації 10^{-3} сприяє синтезу екзометаболітів з антифунгальною дією і є оптимальним для подальших досліджень. Збільшення концентрації хітозану стримувало ріст колоній бактерій та негативно впливало на показники синтезу антифунгальної активності екзометаболітів, які зазвичай прямо залежать від їх концентрації. Крім того, важливим є клас сполук (зокрема циклічних ліпопептидів), які володіють різним спектром дії. За концентрації 10^{-2} здатність бактерій стримувати ріст грибного міцелію зменшувалась, що може бути пов'язано як зі зменшенням росту колоній, так і пригніченням синтезу екзометаболітів (рис. 3.7).

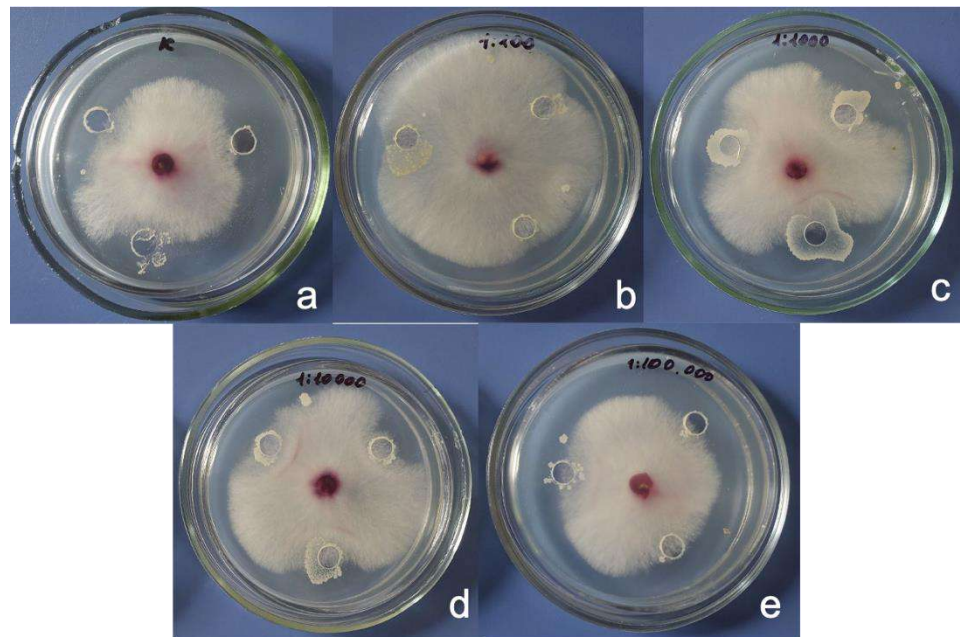


Рис. 3.7 Оцінка антифунгальної активності досліджуваних бактерій, вирощених на ПС з різною концентрацією ГБ хітозану: а – контроль (без додавання хітозану), б – 10^{-2} , с – 10^{-3} , д – 10^{-4} , е – 10^{-5} .

Варто зазначити, що бактеріальні екзометаболіти вплинули також і на щільність грибного міцелію (рис. 3.8, 3.9).

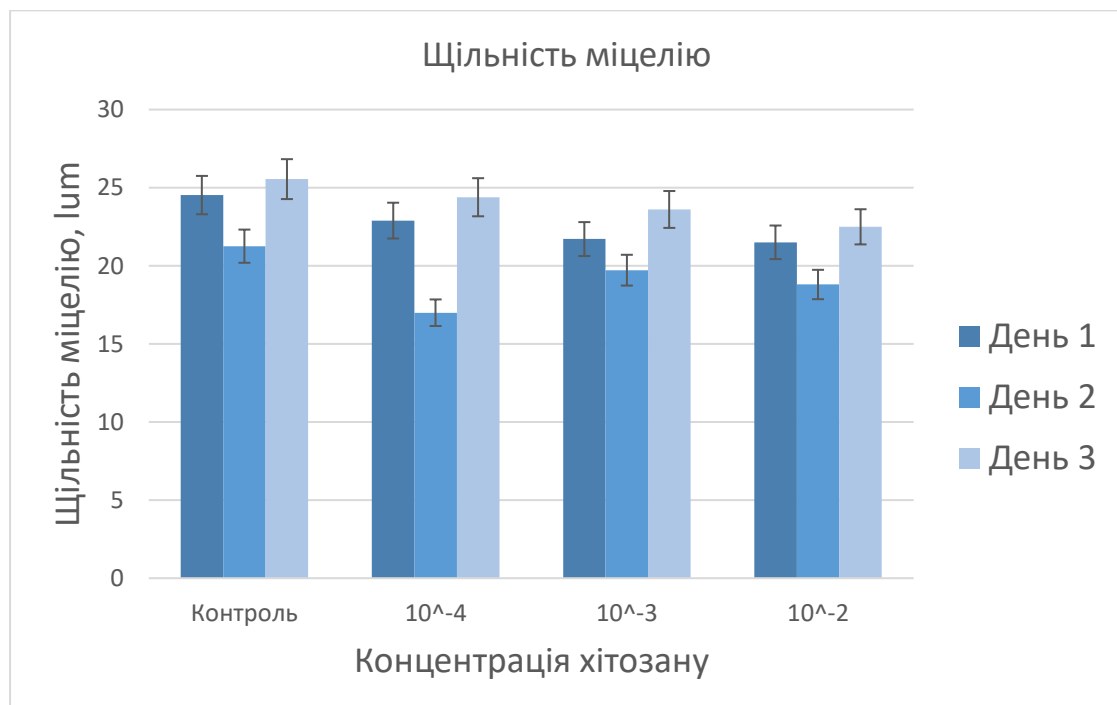


Рис. 3.8 Щільність грибного міцелію із додаванням метаболітів, виділених з культуральної рідини бактерій роду *Bacillus* із використанням різних концентрацій ГБ хітозану

Так, найвищим цей показник був у контрольних зразках, з доданими екзометаболітами бактерій, вирощених на середовищі без додавання хітозану. Другим за щільністю, міцелій був в експерименті, у якому використовували продукти культуральної рідини за додавання хітозану у концентрації 10^{-4} , а найменша щільність була у зразках, отриманих з культуральної рідини із застосуванням концентрації хітозану 10^{-2} .

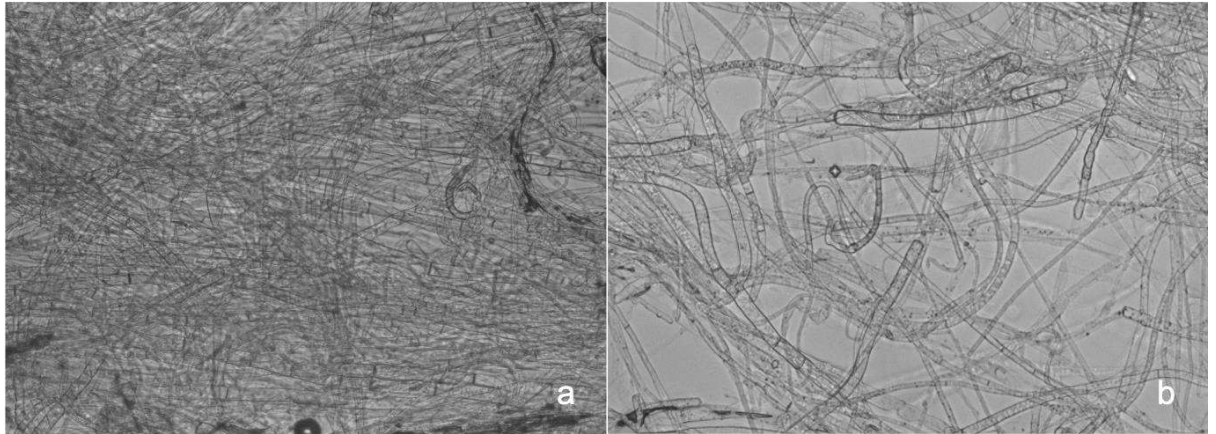


Рис. 3.9 Фото міцелію *Fusarium oxysporum*: а – контрольний зразок; б – зразок міцелію із використанням бактеріальних екзометаболітів, синтезованих із додаванням хітозану у концентрації 10^{-3}

Зіставляючи дані щільності грибного міцелію із даними його площі, можна побачити, що за використання хітозану у концентрації 10^{-3} було отримано менші показники, що вказує на ефективність даної концентрації під час культивування бактерій *Bacillus subtilis* BSFHB та здатність синтезованих екзометаболітів стримувати ріст патогену. Низька щільність також була у зразку з використанням хітозану у концентрації 10^{-2} , проте площа цього ж міцелію була найвищою, тому можна припустити, що низька щільність була зумовлена не дією метаболітів, а навпаки, активним ростом *Fusarium oxysporum*.

Проведене дослідження антифунгальної активності бактеріальних екзометаболітів, вирощених на середовищі із застосуванням хітозану тваринного походження не дало позитивних результатів (рис. 3.10).

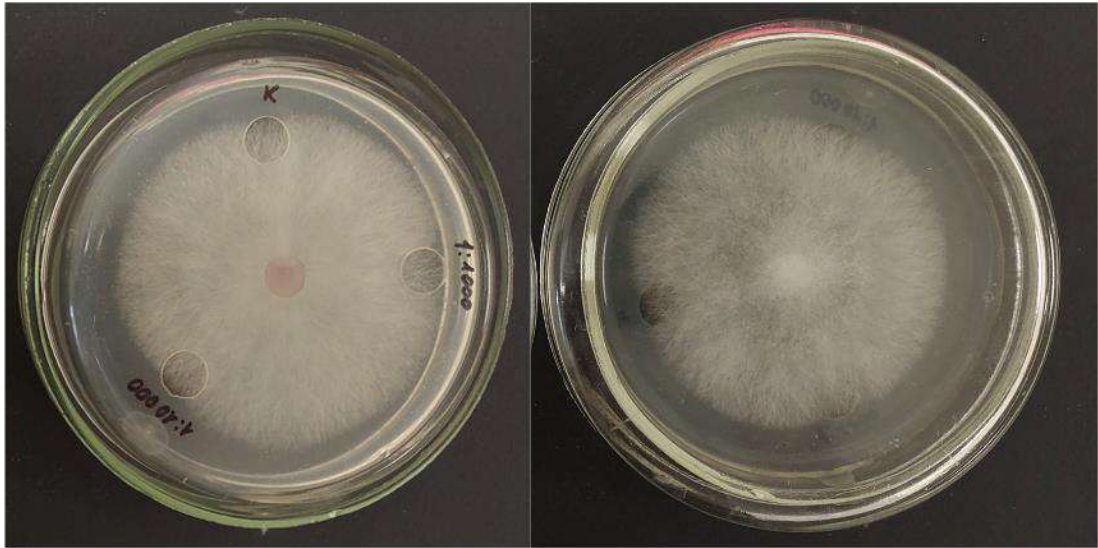


Рис. 3.10 Оцінка антифунгальної активності досліджуваних бактерій, вирощених на ПС з різною концентрацією ТВ хітозану.

Як видно з фото, метаболіти не зупиняють ріст грибного міцелію та не впливають на його щільність. Міцелій є однорідним за структурою та не оминає лунки із досліджуваними зразками.

3.3 Особливості вторинного синтезу культури бактерій під дією хітозанів різного складу і концентрацій

Для виявлення складу екзометаболітів бактерій, присутніх у культуральній рідині за різних умов культивування, застосували метод вискоєфективної тонкошарової хроматографії. Ліпопептиди та інші неполярні сполуки екстрагували з культуральної рідини за стандартною методикою. Вторинні метаболіти екстрагували методом Фолча, згідно якого екстракцію проводили хлороформ-метанолом (2:1) із розрахунку 20 частин суміші на одну частину культуральної рідини.

Так, у результаті хроматографічного аналізу в культуральній рідині Звягінцева за умов вирощування бактерій штаму *Bacillus subtilis* BSFHB було виявлено дві індивідуальні сполуки з коефіцієнтами утримання $R_f \sim 0,28$ і $0,40$. Ці середньополярні речовини виявили яскраву блакитну флуоресценцією в УФ світлі (рис. 3.11). У середовищах Ленді та КДБ за даних умов хроматографування продуктів вторинного синтезу виявлено не було.



Рис. 3.11. Хроматограма продуктів вторинного синтезу штаму *Bacillus subtilis* BSFHB за різних умов культивування: на базових ПС Звягінцева (1), КДА (2), Ленді (3); на ПС Звягінцева за додавання розчину ГБХ (0,1%): 4 – контроль, 5 – розведення ГБХ 1 : 100, 6 – 1 : 1000, 7 – 1 : 10 000, 8 – 1 : 100 000; за додавання розчину ТВХ (0,1%) на першу добу культивування: 9 – контроль, 10 – 1 : 1000, 11 – 1 : 10 000, на другу добу культивування: 12 – контроль, 13 – 1 : 1000, 14 – 1 : 10 000

З умов додавання грибного хітозану у різних концентраціях було виявлено 2 індивідуальні сполуки (табл. 3.2) з коефіцієнтами утримання $R_f \sim 0,40$ і $0,79$. Варто відмітити, що перша з них за показником R_f і блакитною флуоресценцією співпадала з ПС у першому зразку. Пікове значення концентрації цієї речовини було за максимальної концентрації хітозану ПС. Друга з визначених речовин мала темно бурий колір і активно поглинала УФ за довжиною хвилі 365 нм. Вміст цієї сполуки підвищувався при збільшенні ступеня розведення грибного хітозану в межах від 1 : 100 до 1 : 1000. Після досягнення найбільшого значення її концентрація дещо зменшувалась за умов розведення хітозану до 1 : 10 000. За максимальним розведенням розчину грибного хітозану (1 : 100 000) вміст цієї сполуки сягав максимального значення.

Результати фотоденситометричного аналізу продуктів вторинного синтезу штаму *Bacillus subtilis* BSFHB за різних умов культивування на поживних середовищах із додаванням хітозанів грибного і тваринного походження

Пік	Rf	Звг	КДА	Ленді	ГБХ					ТВХ					
		На другу добу			На другу добу					На першу добу			На другу добу		
		**бз	бз	бз	ГБ к	*ГБ 2	ГБ 3	ГБ 4	ГБ 5	ТВ к	ТВ3	ТВ 4	ТВ к	ТВ 3	ТВ 3
1	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0	57,4	83,6	71,7	0	0	0
2	0,28	25,5	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	97,6	125,2	139,0	119,1	100,8	79,3
3	0,40	104,7	0	0,0	0,0	220,2	115,0	91,7	169,4	272,9	329,3	336,6	200,0	194,7	131,4
4	0,79	0,0	0	0,0	107,0	149,7	199,0	167,0	223,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	0,82	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	101,4	119,8	150,7	79,6	104,4	58,6
	Сума	130,1	0	0,0	107,0	369,9	314,0	258,7	392,8	471,9	574,3	626,3	398,8	399,9	269,3

* к – базове ПС Звягінцева; ГБ 2, ГБ 3, ГБ 4, ГБ 5 і ТВ 3, ТВ 4 – ступінь розведення 0,1% розчинів хітозанів грибного і тваринного походження в 100, 1000, 10 000 і 1000 000 раз відповідно.

** бз – ПС стандартного складу без додавання хітозану

Інші метаболічні профілі було виявлено за умов культивування бактерій *Bacillus subtilis* BSFHB із додаванням хітозану тваринного походження. У культуральній рідині було виявлено 5 індивідуальних сполук з Rf ~ 0,08, 0,28, 0,40 і 0,82. Дві з них (Rf ~ 0,28, 0,40) були характерні для живильного середовища без додавання хітозанів. Низько- і високополярні сполуки були нестабільними. Вони не виявлялись у середовищах із додаванням грибного хітозану і зникали у середовищах на другу добу культивування. Враховуючи той факт, що дослідження властивостей цих екстрактів значної антифунгальної дії не показало, можна відхилити гіпотезу, що ці сполуки є потенційними біофунгіцидами. Водночас ПС із додаванням ГБХ, де виявлена речовина з Rf ~ 0,79 мала антифунгальну дію, що дозволяє розглядати її як потенційний фунгіцид.

В цілому було виявлено ефект зміни вторинного метаболізму у бактерій в залежності від присутності у ПС хітозану різного походження. Для встановлення

потенційних біохімічних маркерів чутливості бактерій *Bacillus subtilis* BSFHB було проведено аналіз головних компонент і ортогонально-дискримінантний аналіз, які підтвердили достовірність чутливості бактерій на природу хітозану за різницею у продуктах вторинного метаболізму (рис. 3.12).

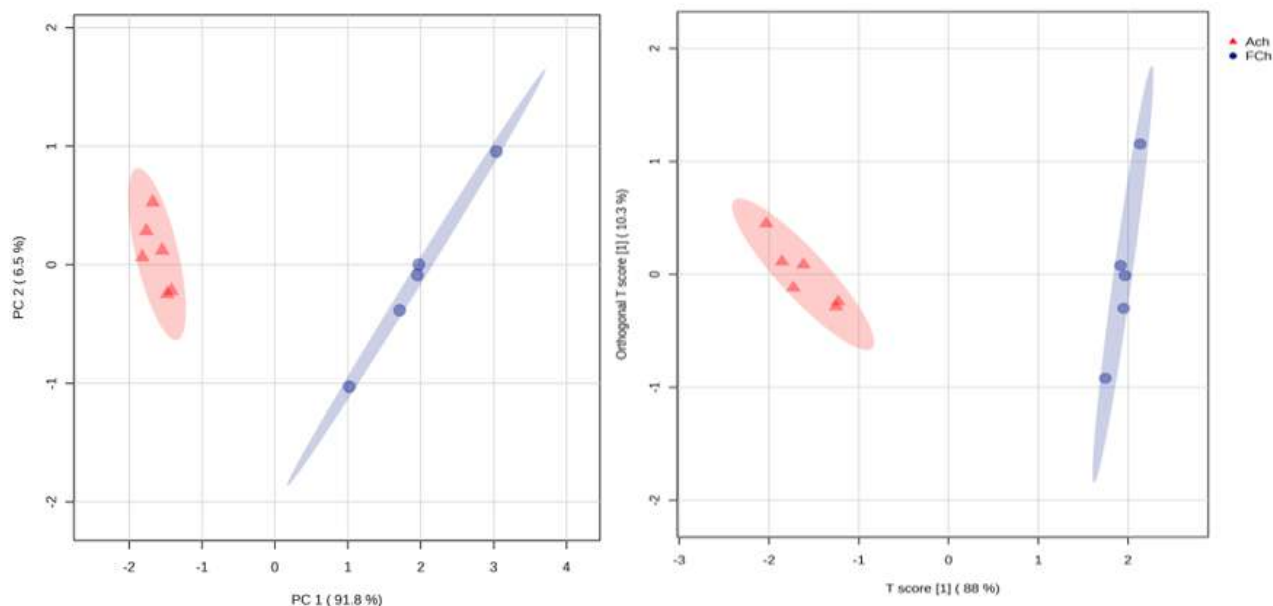


Рис. 3.12 Плот графіки результатів аналізу головних компонент (АГК) і ортогонально-дискримінантного аналізу (ОДА) метаболічних профілів езкометаболітів *Bacillus subtilis* BSFHB за різних умов культивування; Ach – за додавання хітозану тваринного походження, FCh – за додавання хітозану грибного походження

На представленому графіку результату аналізу головних компонент показано, що перша головна компонента (PC1) описує 91,8% загальної дисперсії, яка визначає суттєву різницю в метаболізмі бактерій за дії різних хітозанів. Друга головна компонента (PC2) характеризує 6,5% від загальної дисперсії і переважно описує відмінності в середені групи зразків, як пояснюються концентраціями розчинів хітозану у складі ПС. Варто також зазначити, що на графіку за еліпсами достовірності на рівні $p \leq 0,05$ і характеру розподілу зразків уздовж другої компоненти очевидно, що чутливість бактерій до концентрації ГБХ набагато вища за ТВХ, що важливо враховувати при його застосуванні. Ортогонально-дискримінантний аналіз підтвердив результати аналізу головних компонент.

Високе значення вісі T-score на графіку вказує на те, що кожен із залучених до аналізу зразків культуральної рідини дійсно відповідає окремій групі за типом хітозану. Orthogonal T-score вісь дозволила виявити додаткові відмінності між групами, що переважно пов'язані з інтенсивністю метаболізму, яка не була повністю пояснена основним напрямком дискримінації.

Для визначення ролі кожного з досліджених метаболітів у реакції бактерій на походження хітозану було проведено вулкан-плот аналіз (рис. 3.13).

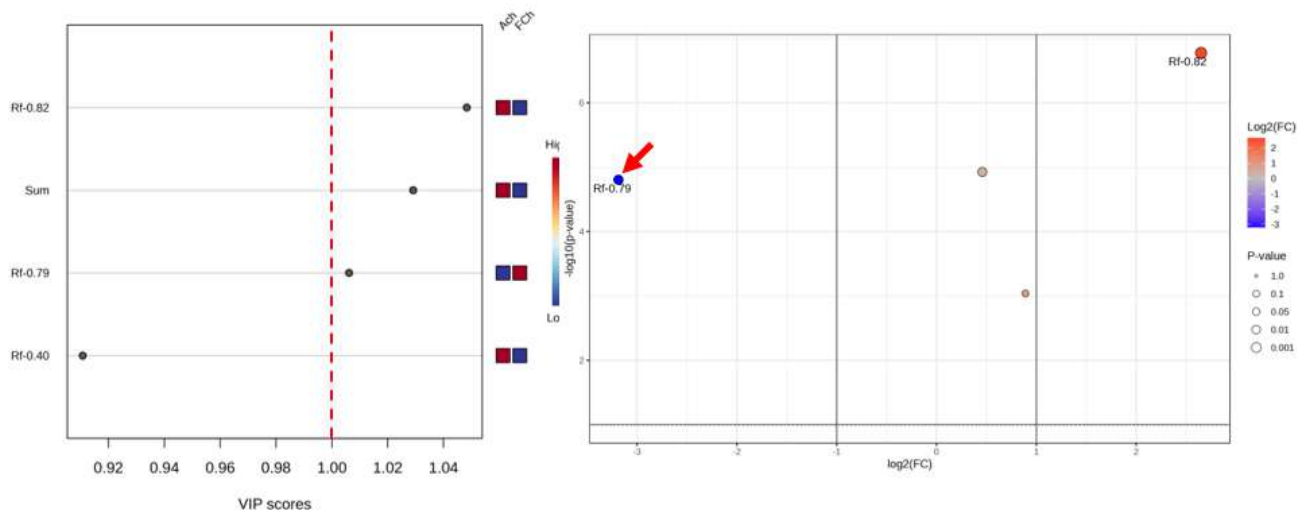


Рис. 3.13 Графіки важливих змінних в проекції (VIP-scores) і вулкан-плот аналізу для метаболічних профілів ескометаболітів *Bacillus subtilis* BSFHB за модифікованих поживних середовищ із додаванням хітозанів різного походження

На графіку вісь абсцис ($\log_2(\text{FC})$) характеризує логарифмічне відношення концентрацій індивідуальної сполуки у двох порівнюваних групах. Чим більше відхилення від нуля, тим більша відмінність у концентрації, а вісь ординат ($-\log_{10}(\text{p-value})$) свідчить про рівень статистичної значущості відмінностей відповідної хімічної сполуки. Чим вище значення негативного логарифму для певної ознаки, тим менша ймовірність того, що встановлена для нього відмінність є випадковою. Речовина з фактором утримання $R_f \sim 0,79$, яка розглядається як потенційно цільовий продукт з антифунгальною дією розташована значно вище горизонтальної лінії, яка вказує на пороговий рівень р-значення, а знаходиться в лівому кутку графіка далеко від вертикальної лінії, яка визначає порогові рівні кратних відмінностей. Отже, ця сполука розташована

значно вище горизонтальної і лівіше вертикальної лінії і тому може вважатися біологічно значимою. Аналогічні показники характерні для речовини з $R_f \sim 0,82$, але вона знаходиться правіше позитивного порогового значення кратних відмінностей.

На графіку важливих змінних в проекції VIP-скори (Variable Importance in Projection) ці речовини також відображені важливими для побудованої дискримінантної моделі і можуть розглядатись як потенційні біомаркери чутливості бактерій на хітозани різного походження. Не виключено, що подібна реакція є наслідком генетично закріплених у бактерій метаболічних патернів, які пов'язані з пристосуванням бактеріальних колоній *Bacillus subtilis* BSFHB до присутності живих організмів, або продуктів їхньої життєдіяльності в навколишньому середовищі.

3.4 Результати проведення ПЛР у реальному часі (Real-time PCR)

Для того, щоб оцінити активність експресії генів, що відповідають за синтез досліджуваних циклічних ліпопептидів культивованими бактеріями, було проведено ПЛР у реальному часі із застосуванням праймерів ітурину, сурфактину, фенгіцину та бациломіцину (рис. 3.14). Результати даного дослідження доводять, що досліджуваний штам бактерій має усі чотири гени циклічних ліпопептидів, які володіють високим рівнем експресії.

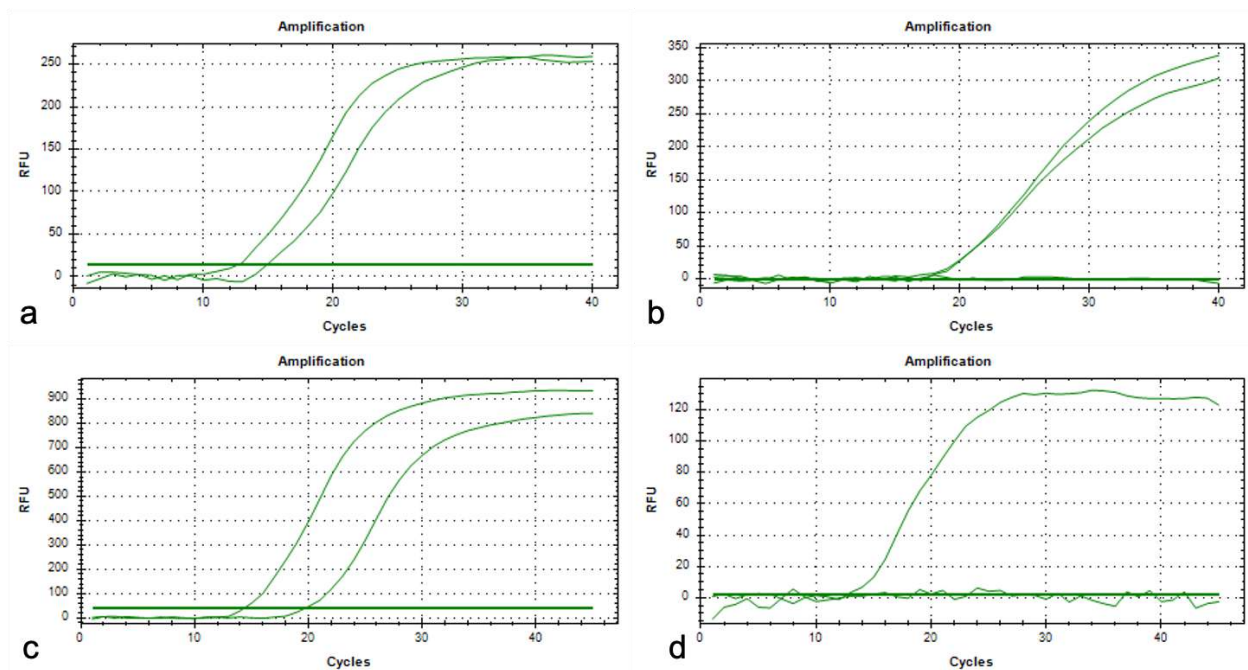


Рис. 3.14 Криві накопичення продуктів ампліфікації генів циклічних ліпопептидів бактерій *B. subtilis* та *B. amyloliquefaciens* (ампліфікація генів а – ітуруну, б – бациломіцину, с – фенгіцину, d - сурфактину).

Результати даного дослідження доводять, що досліджуваний штам бактерій *Bacillus subtilis* BSFHB має усі чотири гени циклічних ліпопептидів, які володіють високим рівнем експресії.

Після культивування бактерій на середовищі із додаванням хітозану також було проведено ПЛР у реальному часі з метою оцінити здатність даного компонента впливати на експресію досліджуваних генів (рис. 3.15).

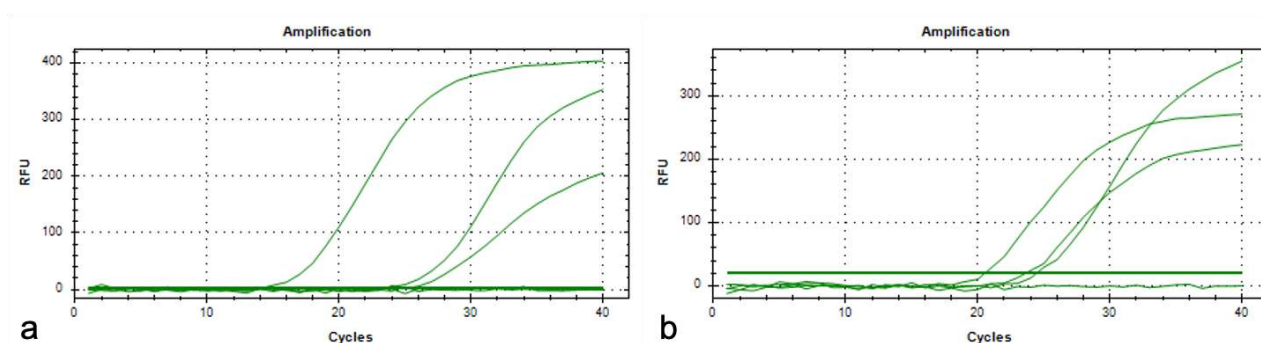


Рис. 3.15 Криві накопичення продуктів ампліфікації генів циклічних ліпопептидів бактерій *Bacillus subtilis* BSFHB (а – грибний хітозан, б – тваринний хітозан).

За результатами даного ПЛР аналізу, вдалось детектувати експресію трьох генів циклічних ліпопептидів: ітурину, баціломіцину та фенгіцину. Отримані графіки ампліфікації показали, що експресія генів циклічних ліпопептидів була нижчою для бактерій, культивованих під впливом ТВХ у порівнянні з культивуванням на середовищі із використанням ГБХ. Про це свідчить не тільки зниження показника порогового значення сигналу флуоресценції C_q , але й зменшення сигналу флуоресценції (Δ RFU) кривих накопичення копій ДНК.

Можна побачити, що експресія генів ітурину є найвищою, що напряму впливає на здатність даних культур бактерій сповільнювати ріст патогенних грибів, оскільки дана сполука має яскраво виражені антифунгальні властивості.

ВИСНОВКИ

1. Циклічні ліпопептиди, синтезовані бактеріями роду *Bacillus* мають яскраво виражені антибактеріальну та антифунгальну дії, що робить їх перспективними для застосування у багатьох галузях, особливо у захисті рослин проти фітопатогенів. Саме тому важливо підібрати оптимальні умови які будуть здатні забезпечити розмноження та активний метаболізм клітин. Оскільки ефективність культивування напряду залежить від складу поживного середовища, воно повинно містити збалансований склад усіх необхідних макро- та мікроелементів, у кількостях що не пригнічуватимуть синтез цільових сполук і при цьому бути економічно вигідним.

2. Спектрофотометричний аналіз показав, що найбільш оптимальним для синтезу досліджуваних циклічних ліпопептидів складом володіє середовище Звягінцева, а саме присутність у ньому таких компонентів, як пептон та дріжджовий екстракт, які здатні забезпечити наявність усіх необхідних амінокислот. Культуральна рідина із застосуванням саме цього ПС володіла найвищою концентрацією бактеріальних клітин як на першу, так і на третю добу культивування із абсорбцією світла 1,90 та 1,69 у.о. відповідно.

3. Застосування тонкошарової хроматографії показало значну різницю у якісному та кількісному складі метаболітів, які містились у культуральній рідині, в залежності від складу ПС. Так, порівнюючи стандартні середовища, саме на середовищі Звягінцева було ідентифіковано дві індивідуальні сполуки з яскравою блакитною флуоресценцією та коефіцієнтами утримання $R_f \sim 0,28$ та $0,40$. Остання сполука, та ще одна із коефіцієнтом $R_f \sim 0,79$ була характерною для культуральної рідини, де застосовувався ГБХ. Обидві сполуки мали прямо протилежну залежність від концентрації хітозану. У зразках із застосуванням тваринного хітозану було ідентифіковано п'ять індивідуальних сполук з коефіцієнтами утримання $R_f \sim 0,08, 0,28, 0,40$ і $0,82$. Перша та остання сполуки не були характерними для попередніх зразків, а їх концентрація зменшувалась з тривалістю культивування.

4. Дослідження антифунгальної активності отриманих бактеріальних екзометаболітів показали значну різницю у рості та щільності грибного міцелію, що також залежало від складу ПС, на якому проводилось культивування бактерій. Так, середовища Звягінцева та Ленді були найбільш ефективними, оскільки метаболіти, синтезовані на даних ПС помітно зупиняли ріст міцелію. Наявність хітозану, його походження та концентрація дали різні результати. Зокрема, найкращим у ролі еліситору був грибний хітозан, оскільки, у порівнянні з тваринним, він сприяв накопиченню метаболітів, здатних стримувати ріст *Fusarium oxysporum*. Як показали дослідження, найбільш оптимальною є концентрація ГБХ 10^{-3} . Із використанням саме такої кількості хітозану у культуральному середовищі, було отримано метаболіти, здатні не лише ефективно стримувати ріст міцелію, але й зменшувати його щільність.

5. Таким чином, поєднуючи збалансований склад ПС та додавання еліситора, здатного стимулювати вироблення бактеріальними клітинами вторинних метаболітів, можна забезпечити високий вихід певного цільового продукту, однак для кращого розуміння взаємодії усіх факторів навколишнього середовища із бактеріальними клітинами, доцільно проводити додаткові дослідження.

Список використаних джерел

1. Meena KR, Kanwar SS. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *BioMed Research International* 2015. 473050.
2. Patel, S., Ahmed, S. & Eswari, J.S. Therapeutic cyclic lipopeptides mining from microbes: latest strides and hurdles. *World J Microbiol Biotechnol* 2015. 1177–1193.
3. Emmert EA, Handelsman J. Biocontrol of plant disease: a (gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol Lett*, 1999. pp. 1–9.
4. Roongsawang N, Washio K, Morikawa M. Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *Int J Mol Sci*. 2011. vol. 12, no. 1, pp. 141–172.
5. Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol*. 2008. vol. 16, no. 3, pp. 115–125.
6. Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, Marchant R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010. vol. 87, no. 2, pp. 427–444.
7. Cao XH, Wang AH, Wang CL, Mao DZ, Lu MF, Cui YQ, Jiao RZ. Surfactin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS/JNK-mediated mitochondrial/caspase pathway. *Chem Biol Interact*. 2010. vol. 183, no. 3, pp. 357–362.
8. Nitschke, M. and Costa, S.G.V.A.O. Biosurfactants in Food Industry. *Trends in Food Science & Technology*. 2007. vol. 18, no. 5, pp. 252–259.
9. Abdel-Mawgoud AM, Aboulwafa MM, Hassouna NA. Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Appl Biochem Biotechnol*. 2008. vol. 150, no. 3, pp. 289–303.
10. Mulligan C. N., Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 2009. vol. 14, no. 5, pp. 372–378.
11. Cochrane SA, Vederas JC. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates. *Med Res Rev*. 2016. pp. 4-31.

12. Raaijmakers JM, De Bruijn I, Nybroe O, Ongena M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. FEMS Microbiol Rev. 2010. volume 34, Pages 1037–1062.

13. Janek, T., Łukaszewicz, M. & Krasowska, A. Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens*BD5. BMC Microbiol, 2012. 12, 24.

14. Singh, L.S., Sharma, H. & Talukdar, N.C. Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. BMC Microbiol, 2014. 14, 278.

15. Thies S, Santiago-Schübel B, Kovačić F, Rosenau F, Hausmann R, Jaeger KE. Heterologous production of the lipopeptide biosurfactant serrawettin W1 in *Escherichia coli*. J Biotechnol. 2014. pp.27-30.

16. Hajfarajollah, H., Mokhtarani, B. & Noghabi, K.A. Newly Antibacterial and Antiadhesive Lipopeptide Biosurfactant Secreted by a Probiotic Strain, *Propionibacterium Freudenreichii*. Appl Biochem Biotechnol. 2014. 174, 2725–2740.

17. Shiono Y, Tsuchinari M, Shimanuki K, Miyajima T, Murayama T, Koseki T, Laatsch H, Funakoshi T, Takanami K, Suzuki K. Fusaristatins A and B, two new cyclic lipopeptides from an endophytic *Fusarium* sp. J Antibiot (Tokyo). 2007. 60, 309–316.

18. Baumgart F, Kluge B, Ullrich C, Vater J, Ziessow D. Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy. Biochem Biophys Res Commun. 1991. pp. 998-1005.

19. Shao, C.; Liu, L.; Gang, H.; Yang, S.; Mu, B. Structural Diversity of the Microbial Surfactin Derivatives from Selective Esterification Approach. Int. J. Mol. Sci. 2015. pp. 1855-1872.

20. Seydlová G., Čabala R. and Svobodová J. Biomedical engineering, trends, research and technologies,” in Surfactin—Novel Solutions for Global Issues. 2011. vol. 13, pp. 306–330.

21. Korenblum E, de Araujo LV, Guimarães CR, de Souza LM, Sasaki G, Abreu F, Nitschke M, Lins U, Freire DM, Barreto-Bergter E, Seldin L. Purification and characterization of a surfactin-like molecule produced by *Bacillus* sp. H2O-1 and its antagonistic effect against sulfate reducing bacteria. *BMC Microbiology*, 2012. vol. 12, article 252.
22. Tang JS, Gao H, Hong K, Yu Y, Jiang MM, Lin HP, Ye WC, Yao XS. Complete assignments of (1)H and (13)C NMR spectral data of nine surfactin isomers. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2007. vol. 45, no. 9, pp. 792–796.
23. Zou A, Liu J, Garamus VM, Yang Y, Willumeit R, Mu B. Micellization activity of the natural lipopeptide [Glu1, Asp5] surfactin-C15 in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2010. vol. 114, no. 8, pp. 2712–2718.
24. Pathak, K.V., Keharia, H. Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. *3 Biotech*, 2014. 4, pp. 283–295.
25. Ali S, Hameed S, Imran A, Iqbal M, Lazarovits G. Genetic, physiological and biochemical characterization of *Bacillus* sp. strain RMB7 exhibiting plant growth promoting and broad spectrum antifungal activities. *Microb Cell Fact*. 2014. p. 144.
26. Zeriuoh H, Romero D, Garcia-Gutierrez L, Cazorla FM, de Vicente A, Perez-Garcia A. The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits. *Mol Plant Microbe Interact*, 2011. pp. 1540-52.
27. Gong AD, Li HP, Yuan QS, Song XS, Yao W, He WJ, Zhang JB, Liao YC. Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. *PLoS One*, 2015. 10(2):e0116871.
28. Aranda F. J., Teruel J. A., and Ortiz A., Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochimica et Biophysica Acta—Biomembranes*, 2005. vol. 1713, no. 1, pp. 51–56.

29. Tsuge K., Akiyama T., and Shoda M. Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *Journal of Bacteriology*, 2001. vol. 183, no. 21, pp. 6265–6273.

30. Deleu M., Paquot M., and Nylander T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophysical Journal*, 2008. vol. 94, no. 7, pp. 2667–2679.

31. Honma M, Tanaka K, Konno K, Tsuge K, Okuno T, Hashimoto M. Termination of the structural confusion between plipastatin A1 and fengycin IX. *Bioorg Med Chem*. 2012. 20(12):3793-8.

32. Akpa E, Jacques P, Wathelet B, Paquot M, Fuchs R, Budzikiewicz H, Thonart P. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2001. vol. 91-93, pp. 551–561.

33. Nasir MN, Laurent P, Flore C, Lins L, Ongena M, Deleu M. Analysis of calcium-induced effects on the conformation of fengycin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.*, 2013. 450-457.

34. Horn JN, Cravens A, Grossfield A. Interactions between fengycin and model bilayers quantified by coarse-grained molecular dynamics. *Biophys J.*, 2013. pp. 1612-23.

35. Guo Q, Dong W, Li S, Lu X, Wang P, Zhang X, Wang Y, Ma P. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. *Microbiol Res.*, 2014. 169(7-8):533-40.

36. Pathak K. V., Keharia H., Gupta K., Thakur S. S., and Balaram P. Lipopeptides from the banyan endophyte, *Bacillus subtilis* K1: mass spectrometric characterization of a library of fengycins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2012. vol. 23, no. 10, pp. 1716–1728.

37. Kim PI, Bai H, Bai D, Chae H, Chung S, Kim Y, Park R, Chi YT. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *J Appl Microbiol.*, 2004. 97(5):942-9.

38. Hbid C. Contribution à l'étude de la relation entre la structure des lipopeptides de *Bacillus subtilis* et leurs activités hémolytique et antifongique : дис. – Liège, Belgium : University of Liège, 1996.

39. Bland, J., Lax, A., and Klich, M. Proceedings of the Twenty-Second European Peptide Symposium, Schneider, C. H. and Eberle, A. N., eds., ESCOM, Leiden, The Netherlands, 1993. pp. 332-333.

40. Harnois I., Maget-Dana R., Ptak M. Methylation of the antifungal lipopeptide iturin A modifies its interaction with lipids. *Biochimie*, 1989. T. 71. №. 1. C. 111-116.

41. Thimon L., Peyoux F., Maget-Dana R., Micael G. Surface-active properties of antifungal lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*. *J Am Oil Chem Soc.*, 1992. 69, pp. 92–93.

42. Jacques P., Hbid C., Destain J., Razafindralambo H., Paquot M., De Pauw E., and Thonart P. Optimization of Biosurfactant Lipopeptide Production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman Design. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 1999. pp. 77-79, 223-233.

43. Hashizume H., Nishimura Y. Cyclic lipopeptide antibiotics. *Studies in natural products chemistry*, 2008. T. 35. C. 693-751.

44. Hong Zhou, Bailin Cong, Yongqi Tian, Yu He, Huanghao Yang, Characterization of novel cyclic lipopeptides produced by *Bacillus* sp. SY27F. *Process Biochemistry*, 2019. Volume 83, Pages 206-213,

45. Wang Y., Zhang C., Liang J., Wu L., Gao W. and Jiang J. Iturin A Extracted From *Bacillus subtilis* WL-2 Affects *Phytophthora infestans* via Cell Structure Disruption, Oxidative Stress, and Energy Supply Dysfunction. *Front. Microbiol.*, 2020. 11:536083.

46. Qingwei Gong, Chong Zhang, Fengxia Lu, Haizhen Zhao, Xiaomei Bie, Zhaoxin Lu, Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbJ and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. *Food Control*, 2014. Volume 36, Issue 1, Pages 8-14.

47. Besson F., Peypoux F., Michel G., Delcambe L. Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*. J Antibiot (Tokyo), 1976. 29(10):1043-9.

48. Peypoux F., Besson F., Michel G., & Delcambe L. Structure of bacillomycin d, a new antibiotic of the iturin group. European journal of biochemistry, 2005. 118(2), pp. 323–327.

49. Volpon L., Besson F. and Lancelin J.-M. NMR structure of active and inactive forms of the sterol-dependent antifungal antibiotic bacillomycin L. European Journal of Biochemistry, 1999. 264: 200-210.

50. Yuan, J., Li, B., Zhang, N., Waseem, R., Shen, Q., & Huang, Q. Production of Bacillomycin- and Macrolactin-Type Antibiotics by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 for Suppressing Soilborne Plant Pathogens. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. 60(12), pp. 2976–2981.

51. Chen, X., Lu, Y., Shan, M. et al. A mini-review: mechanism of antimicrobial action and application of surfactin. World J Microbiol Biotechnol, 2022. 38, 143.

52. Sun D, Liao J, Sun L, Wang Y, Liu Y, Deng Q, Zhang N, Xu D, Fang Z, Wang W, Gooneratne R. Effect of media and fermentation conditions on surfactin and iturin homologues produced by *Bacillus natto* NT-6: LC-MS analysis. AMB Express, 2019. 9(1):120.

53. Monteiro, Fernando & Medeiros, Flavio & Ongena, Marc & Franzil, Laurent & Paulo, Estevao & Jorge, Teodoro. Effect of temperature, pH and substrate composition on production of lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* 629. African Journal of Microbiology Research. 2016. 10. 1506-1512.

54. Narendra Kumar P, Swapna TH, Khan MY, Reddy G, Hameeda B. Statistical optimization of antifungal iturin A production from *Bacillus amyloliquefaciens* RHNK22 using agro-industrial wastes. Saudi J Biol Sci. 2017. 24(7):1722-1740.

55. Zhang X, Chen X, Qiao X, Fan X, Huo X, Zhang D. Isolation and yield optimization of lipopeptides from *Bacillus subtilis* Z-14 active against wheat take-all caused by *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. J Sep Sci., 2021. 44(4):931-940.

56. Chen, L., Zhang, H., Zhao, S. et al. Lipopeptide production by *Bacillus atrophaeus* strain B44 and its biocontrol efficacy against cotton rhizoctoniosis. *Biotechnol Lett.*, 2021. 43, pp. 1183–1193.

57. Fahim S, Dimitrov K, Gancel F, Vauchel P, Jacques P, Nikov I. Impact of energy supply and oxygen transfer on selective lipopeptide production by *Bacillus subtilis* BBG21. *Bioresour Technol.*, 2012. 126:1–6.

58. Biniarz P., Henkel M., Hausmann R. and Łukaszewicz M. Development of a Bioprocess for the Production of Cyclic Lipopeptides Pseudofactins With Efficient Purification From Collected Foam. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. 8:565619.

59. Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., and de Kock, M. J. D. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas spp.*: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2006. 19 (7), pp. 699–710.

60. Batianis C, Kozaeva E, Damalas SG, Martín-Pascual M, Volke DC, Nickel PI, Martins Dos Santos VAP. An expanded CRISPRi toolbox for tunable control of gene expression in *Pseudomonas putida*. *Microb Biotechnol.*, 2020. 13(2):368-385.

61. Meleshko D, Mohimani H, Tracanna V, Hajirasouliha I, Medema MH, Korobeynikov A, Pevzner PA. BiosyntheticSPAdes: reconstructing biosynthetic gene clusters from assembly graphs. *Genome Res.*, 2019. 29(8):1352-1362.

62. Zhou L., Höfte M. and Hennessy RC. Does regulation hold the key to optimizing lipopeptide production in *Pseudomonas* for biotechnology? *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2024. 12:1363183.

63. Kang BR, Song YS, Jung WJ. Differential expression of bio-active metabolites produced by chitosan polymers-based *Bacillus amyloliquefaciens* fermentation. *Carbohydr Polym.*, 2021. 260:117799.

64. Хархота М.А., Рибальченко Н.П., Грабова Г.Ю., Авдеева Л.В., Методи дослідження метаболітів бактерій родини Bacillaceae: наук.-метод. рек. ; НАН України, Ін-т мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного. - Київ : Компринт, 2021. - 170 с.

65. Пирог Т.П., Конон А.Д., Софілканич А.П. Мікробні поверхнево-активні речовини. II. Ліпопептиди. *Biotechnologia Acta.* 2014. Vol. 7, № 2. С.9-25.

ДОДАТКИ

Додаток А

ПРОГРАМА	
III ВСЕУКРАЇНСЬКОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ ЗДОБУВАЧІВ ВИЩОЇ ОСВІТИ, ПРИСВЯЧЕНУ ДО 126-РІЧЧЯ НУБІП УКРАЇНИ	
«ДОСЯГНЕННЯ І ПЕРСПЕКТИВИ В ЗАХИСТІ ТА КАРАНТИНІ РОСЛИН»	
23 квітня 2024 року	
11:00 – 11:30	– Реєстрація учасників конференції
11:30 – 12:00	– Відкриття конференції
	<i>Коломієць Ю.В.</i> – декан факультету захисту рослин, біотехнологій та екології НУБІП України
	<i>Пітовський М.Й.</i> – професор кафедри фітопатології ім. акад. В.Ф. Пересікіна НУБІП України
12:00 – 12:30	– Планарне засідання
	<i>Дозь М.М.</i> – завідувач кафедри ентомології, інтегрованого та захисту та карантину рослин НУБІП України, заступник голови оргкомітету
	<i>Гентон Д.Т.</i> – завідувач кафедри фітопатології ім. акад. В.Ф. Пересікіна, заступник голови оргкомітету;
12:30 – 14:30	– Наукові доповіді учасників конференції
12:30 – 13:00	– Секція: 1. Ентомологія
	1. <i>Костенко П.О., Кава Л.П.</i> ХРЕСТОЦВІТІ БЛІШКИ НА ПОСІВАХ ОЗИМОГО РІПАКУ В УМОВАХ ВП «АГРОНОМІЧНА ДОСЛІДНА СТАНЦІЯ» НУБІП УКРАЇНИ.
	2. <i>Крижун К.В., Кава Л.П.</i> ЕНТОМОКОМПЛЕКС СУНИЦЬ
	3. <i>Мирошник О.В., Кава Л.П.</i> ЕКОНОМІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАХИСТУ ЯБЛУНИ ВІД ЯБЛУНЕВОГО ПЛОДОВОГО ПИЛІЦЬКА
	4. <i>O. Myshkovicz, O. Statkevich</i>
	9. <i>Зварів М.А., Кайко О.А.</i> VOLVABIELLA VOLVACEA У БІОТЕХНОЛОГІЇ: ПОТЕНЦІАЛ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ
	10. <i>Іванова Т.Д., Коломієць Ю.В.</i> КОМПЛЕКСНЕ ОДНОВАННЯ ЯКОСТІ І БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВОЇ ПРОДУКЦІЇ
	11. <i>Костенко П.О., Лубина О.В.</i> СПОСОБИ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ШНІВНИЦЬ ДЛЯ ВВЕДЕННЯ В УМОВАХ IN VITRO
	12. <i>Касюра В.Ю., Пестерова Н.Г.</i> ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ ГІДРОЛІЗАТУ ДРЕВЖИВ ЯК БОЛОТНОГО ЗАХИСТУ РОСЛИНИ SARACUM ANNUM
	13. <i>Кірей А.А., Коломієць Ю.В.</i> ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ТА ОСОБЛИВОСТЕЙ МІКРОКЛОНИВАННЯ В УМОВАХ IN VITRO ДЛЯ РОЗВЕДЕННЯ СОРТІВ ЛОХИНИ ВИСОКОКОНЦЕНТРАЦІЙНОГО VASCULUM SOLANACEAE...
	14. <i>Козлова С.О., Бердєєв В.В.</i> ОПТИМІЗАЦІЯ БІОСЕНТЕТУ ЦИКЛІЧНИХ ЛІКВІДЕНТІВ БАКТЕРІЙНОГО РОДУ VASCILLUS
	15. <i>Коваленко Д.О., Касюра В.Ю.</i> БАКТЕРІАЛЬНІ ФІТОПАТОГЕНІ КАРТОПЛІ SOLANUM TUBEROSUM L.
	16. <i>Курішова О.О., Коваленко А.В.</i> ОСОБЛИВОСТІ ВИВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ IN VITRO КЛЕМАТИСА МАНЖУРСЬКОГО (CLEMATIS MANCHURICA BURR.)
	17. <i>Костенко П.О., Лубина О.В.</i> ОСОБЛИВОСТІ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ ВЕРЕН ДЛЯ ВИВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ IN VITRO
	18. <i>Кривітос І.В., Пестерова Н.Г.</i> ПРАВОВІ НОРМИ БІОЛОГІЧНОГО ЗАХИСТУ НАСЕЛЕННЯ, ТВАРИН І РОСЛИН
	19. <i>Левченко Т.Р., Діаченко А.В.</i> ОЦІНКА ПОТЕНЦІАЛУ СПІВНОСТІ ДО ПОСУХИ ПІВНІВНО-ОСІМНОГО TRICLIS AESTIVUM L.
	20. <i>Лукаш А.С., Стефанюк Т.Р.</i> ФІТОПАРАЗИТИЧНІ МЕТОДИ ТРЬОХ ЕНЕРГЕТИЧНИХ КУЛЬТУР ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА БІОПАЛІВА
	21. <i>Майданчик Н.Р., Лубина О.В.</i> ОСОБЛИВОСТІ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ SALVIA OFFICINALIS ДЛЯ ВИВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ IN VITRO

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ	
ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ І ЕКОЛОГІЇ	
ЗБІРНИК	
матеріалів доповідей	
X МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ І МОЛОДИХ ВЧЕНИХ	
	
«ЕКОЛОГІЯ – ФІЛОСОФІЯ ІСНУВАННЯ ЛЮДСТВА»	
24-25 квітня 2024 р.	
Київ – 2024	
1	

<i>Лавришкіна О.В., Пестерова Н.Г.</i> ІНФОРМАЦІЙНІ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЧНОГО КОНТРОЛЮ ВІДЛИВ НА ДОВКІЛЛЯ	97
<i>Касюра В.Ю., Пестерова Н.Г.</i> ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ АЛІВНОЇ ОЛІЇ	99
<i>Зеленко В.А., Пестерова Н.Г.</i> ОЦІНКА ВІДЛИВ ПЕСТИЦИДІВ НА ДОВКІЛЛЯ ПІРІ ВИРОЩУВАННЯ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ КУЛЬТУРИ	101
<i>Зеленко Д.О., Бердєєв В.В.</i> ОЦІНКА ГЛОБАЛЬНОЇ ЕКОЛОГІЧНОЇ КРИЗИ	103
<i>Козлова С.О., Пестерова Н.Г.</i> ДЕКОРАТИВНІ ДЕРЕВ'ЯНІ ВІДЛИ РОСЛИН ЯК МІСТОТВОРОВАЛЬНІ ОДНІСЬ ОЗЕЛЕНЕННЯ МЕГАПОЛІСІВ	104
<i>Витвич А.О., Сербіян Г.А.</i> ЕКОСИСТЕМИ ПОСЛУТИ ВОДНО-БОЛОТНИХ УГІДЬ	106
<i>Іванова Т.Д., Коломієць Ю.В.</i> ОЦІНКА ХАРЧОВОЇ ПРОДУКЦІЇ НА ВЯЛИВІСТЬ ПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ	108
<i>Костенко П.О., Лубина О.В.</i> ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ ВИВЕДЕННЯ ШНІВНИЦЬ В УМОВАХ IN VITRO	110
<i>Касюра В.Ю., Пестерова Н.Г.</i> МОЖЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ ГІДРОЛІЗАТУ ДРЕВЖИВ ДЛЯ ОЦІНКИ ЕКОФІЗИОЛОГІЧНИХ РЕАКЦІЙ РОСЛИНИ SARACUM ANNUM	112
<i>Касюра В.Ю., Тарас О.П.</i> ДОСЛІДЖЕННЯ ЗАБЕЖЕННЯ АНТИГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БОЛОТІВ ВІРУСІВ ДЛЯ ПОЗИТИВНИХ КОНТРОЛІВ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ	114
<i>Кайко М.А., Пестерова Н.Г.</i> ЕКОЦІД УКРАЇНИ – НАСЛІДКИ В ВИРІШЕННІ	117
<i>Костенко П.О., Пестерова Н.Г.</i> РОЛЬ ПІВНІВНО-ОСІМНОГО ПІВНІВНО-ОСІМНОГО БІОРЕЗЕРВУАРИТІА ЕКОСИСТЕМИ	119
<i>Касюра В.Ю., Сербіян Г.А.</i> СВІТОВЕ ВИРОБНИЦТВО БІОПАЛІВА	121
<i>Костенко П.О.</i> БАКТЕРІЙНОГО РОДУ VASCILLUS ЯК ЕФЕКТИВНОЇ ТА БЕЗПЕЧНОЇ ЗАСТІ ЗАХИСТУ РОСЛИНИ РОДІНИ SOLANACEAE ВІД ПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ	122
<i>Курішова О.О., Савченко А.В.</i> АНАЛІЗ ВИВЕДЕННЯ ОРГАНИЧНОГО СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОГО ВИРОБНИЦТВА В НІМЕЧЧИНІ ТА В УКРАЇНІ	125
6	



Latvia University
of Life Sciences
and Technologies

19th International Scientific Conference
STUDENTS ON THEIR WAY TO SCIENCE
(undergraduate, graduate, post-graduate students)
Collection of Abstracts
April 19th, 2024

Jelgava
2024

TABLE OF CONTENTS

AGRICULTURE	8
KOZLOVA S., BORODAY V., EIKHANOV A., THE INFLUENCE OF RACIZEE AMYLOGLUCIFERANT ON THE EXPRESSION OF GENES OF PATHOGENESIS-RELATED (PR) PROTEINS OF TOMATO PLANTS AND THEIR ROLE IN PLANT DEFENCE	9
MUTALOVA A., MURIDOV S., THE CONTRIBUTION OF BIOECONOMY TO THE DEVELOPMENT OF COUNTRY'S ECONOMY: USING THE EXAMPLE OF AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES	18
JAGTAP S., LĀČIS G., ADVANCEMENT OF MOLECULAR RESEARCH TECHNIQUES FOR INVESTIGATING SELF-INCOMPATIBILITY GENETICS IN CHAENOMELIS JAPONICA	11
VANAGS E., CARBONATE CONTENT IN THE SOILS OF ŽEMĀLE PLAIN	12
INFORMATION TECHNOLOGIES	13
AVIŠANS R., ZACEPINS A., OPEN DATA FOR CYBER THREAT INTELLIGENCE	14
BELOVS-DVINSKIS A., KOMAŠILOVS V., JAVASCRIPT SOURCE CODE FUNCTIONAL DOMAINS RECOGNITION USING SENTENCE EMBEDDINGS CLUSTERING	15
MANIVANNAN K., PAURA L., COMPARISON OF SEMANTIC SEARCH APPROACHES	16
KOTOVS D., ZACEPINS A., CAPABILITIES OF OPENSTREETMAP DATA TO SUPPORT PRECISION BEEKEEPING	17
RAWAT P., RUBINA T., USER EXPERIENCE (UX) DESIGN IN E-COMMERCE WEBSITES	18
AKHTAR P., PAURA L., BLOCKCHAIN PROTOCOL EFFICIENCY IN SUPPLY CHAIN AUTHENTICATION	19
SHARMA P., RUBINA T., RECOMMENDER SYSTEMS IN TOURISM: LITERATURE REVIEW	20
RABI K., KOMAŠILOVS V., A COMPARATIVE ANALYSIS OF DEEP LEARNING ARCHITECTURES FOR LIVE VIDEO CAPTIONING SYSTEMS FOR VISUALLY IMPAIRED PEOPLE	21
KUMAR S. S., RUBINA T., AI-BASED INSULIN DOSAGE PREDICTION APPLICATION	22
ŠILINIECE I., VITOLS G., PUBLIC EDUCATIONAL INSTITUTIONS' WEBSITES COMPLIANCE WITH LATVIAN WEB REGULATIONS	23
WARSHANFAN S. S., SMITS L., UNREGULATED DRONES AND THEIR IMPACT	24
FORESTRY	25
EGLINA A., STRAUPE I., LUGUZA S., MEDICINAL PROPERTIES OF WELL-KNOWN TREES AND SHRUBS IN LATVIA	26
JANSONE A., STRAUPE I., EUTROPHICATION OF STREIČI INLAND DUNE MASSIF	27
LEJNIECE A., AKERS R., LUGUZA S., FOREST FIRE CONSEQUENCES ON FIVE SPECIES OF SCOTS PINE	28
MEIKŠANE L., ANTANE E. L., JANSONE R., AFRICAN SWINE FEVER IN LATVIA	29
MĒRNIĒKS M., CELMINA V., ZARINŠ J., ESTIMATING FOREST STAND CHARACTERISTICS USING UNMANNED AERIAL VEHICLES	30
SPROGĪS A., LUGUZA S., NORWAY SPRUCE PICEA ABIES (L.) H. KARST. DEVELOPMENT OF PLANTING MATERIAL ON PEAT SUBSTRATE ENRICHED WITH BIOGAS DIGESTATE	31
STRAUTMANE S., RĀBKOVS E., LUGUZA S., PĒTERSONE A., BIODIVERSITY IN URBAN FORESTS	32
	4