

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

Олена КВАСКО

(підпис)

« ____ » _____ 2025 р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему «Оптимізація процесу культивування *Streptomyces avermitilis* -
біологічного агенту регулятора росту Регоплант»**

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Гарант освітньої програми

Кандидат біологічних наук,
доцент, завідувач кафедри
екобіотехнології та
біорізноманіття

Олена КВАСКО

(підпис)

Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи

Доктор
сільськогосподарських наук,
доцент, доцент кафедри
екобіотехнології та
біорізноманіття

Віра БОРОДАЙ

(підпис)

Виконала

(підпис)

Євгенія ГАНІЧКІНА

КИЇВ – 2025

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

Олена КВАСКО

« ____ » _____ 2025 р.

ЗАВДАННЯ

на виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи студенту

Ганічкіній Євгенії Євгенівні

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи «Оптимізація процесу культивування *Streptomyces avermitilis* - біологічного агенту регулятора росту Регоплант»

затверджена наказом ректора НУБіП України від «22» жовтня 2024 р. №1880

Термін подання завершеної роботи на кафедру 15 травня 2025 року

Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи штами-продуценти *Streptomyces avermitilis*, регулятор росту Регоплант, методика культивування стрептоміцетів.

Перелік питань, які потрібно розробити:

1. Проаналізувати літературні джерела щодо біотехнологічних особливостей *Streptomyces avermitilis* як продуцента біологічно активних метаболітів.
2. Дослідити склад біологічно активних сполук, що входять до складу біостимулятора Регоплант.
3. Визначити оптимальний склад живильного середовища для культивування *S. avermitilis*.
4. Оцінити вплив фізико-хімічних параметрів на інтенсивність росту культури та рівень накопичення вторинних метаболітів.
5. Провести порівняльний аналіз впливу різних умов культивування на продуктивність синтезу метаболітів з урахуванням морфологічних ознак культури.

Дата видачі завдання «1» вересня 2024 року

Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи

_____ (підпис)

Віра БОРОДАЙ

Завдання прийняв до виконання

_____ (підпис)

Євгенія ГАНІЧКІНА

РЕФЕРАТ

Бакалаврська кваліфікаційна робота на тему «Оптимізація процесу культивування *Streptomyces avermitilis* – біологічного агента регулятора росту Регоплант» має загальний обсяг 50 сторінок, містить у собі 3 рисунка та 3 графіка, 29 використаних джерел. Складається з таких розділів:

1. Вступ;
2. Огляд літератури;
3. Матеріали та методи проведення дослідження;
4. Результати дослідження;
5. Висновки та список використаних джерел.

Згідно з поставленою метою було сформульовано завдання:

1. Провести морфологічну та фізіологічну характеристику штамів *Streptomyces avermitilis* AV-10, AV-15, AV-20, що є продуцентами авермектинів.
2. З'ясувати оптимальний температурний режим культивування та його вплив на швидкість росту культури.
3. Дослідити вплив кислотності живильного середовища (рН) на активність росту штаму *S. avermitilis*.
4. Оцінити вплив складу живильного середовища, зокрема наявності мікроелементів і амінокислот, на синтез біологічно активних речовин.

Об'єктом дослідження є процес культивування *Streptomyces avermitilis* – бактерії, що має здатність синтезувати сполуки з вираженою біологічною активністю.

Предмет дослідження - вплив температури, кислотності середовища (рН) та хімічного складу живильного субстрату на ріст культури та її метаболічну активність.

Ключові слова: *Streptomyces avermitilis*, Регоплант, біостимулятор, культивування мікроорганізмів.

ЗМІСТ

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. Значення мікроорганізмів у біотехнології сільського господарства	9
1.2. Характеристика та особливості культивування <i>Streptomyces avermitilis</i> ..	11
1.3. Перспективи використання біостимуляторів у сільському господарстві .	17
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ .	21
2.1. Обладнання та організація біотехнологічної лабораторії в МНТЦ «Агробіотех».....	21
2.2. Характеристика регулятора росту рослин «Регоплант»	24
2.3. Приготування живильних середовищ.....	26
2.4. Морфологічна оцінка досліджуваного штаму <i>Streptomyces avermitilis</i>	32
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ	37
3.1. Вплив температури на ріст культури <i>Streptomyces avermitilis</i>	37
3.2. Вплив показника рН на ріст культури <i>Streptomyces avermitilis</i>	39
3.3. Вплив складу живильного середовища на ріст культури <i>Streptomyces</i> <i>avermitilis</i>	41
ВИСНОВКИ	45
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	47

ВСТУП

У відповідь на глобальні виклики, такі як, наприклад зміна клімату чи деградація ґрунтів, сучасне сільське господарство все більше звертається до інноваційних та екологічно чистих технологій, щоб мати змогу забезпечити стабільне зростання врожайності без шкоди для навколишнього середовища.

Тому все більше зосереджують увагу на біостимулятори нового покоління, основу яких складають метаболіти ґрунтових мікроорганізмів, зокрема актиноміцетів роду *Streptomyces*, які мають виняткову здатність до продукування різноманітних метаболітів з високою біологічною активністю. Одним із найбільш вивчених представників цього роду є *Streptomyces avermitilis* - вид, що відзначається складною регуляцією обміну речовин та широким спектром синтезованих біоактивних сполук, наприклад авермектинів - природних макроциклічних сполук з вираженою антипаразитарною та інсектицидною дією, які широко використовуються як у ветеринарії, так і в аграрному секторі.

Актуальність дослідження полягає в тому, що *S. avermitilis* є перспективним мікроорганізмом-продуцентом метаболітів, що входять до складу ефективного рослинного біостимулятора Регоплант, застосування якого дозволяє підвищити врожайність, покращити якість продукції та зменшити залежність агросектору від хімічних засобів. Зважаючи на те, що продуктивність синтезу цільових сполук безпосередньо залежить від умов культивування мікроорганізму, доведено, що навіть незначні зміни температури чи концентрацій поживних речовин можуть істотно впливати на біосинтетичну активність мікроорганізмів, зокрема на рівень утворення цільових метаболітів, дослідження оптимальних фізико-хімічних параметрів середовища для росту *S. avermitilis* є науково й практично обґрунтованим завданням, вирішення якого дозволить максимізувати продуктивність виробництва біостимуляторів на основі мікробіології та сприятиме розвитку екологічно орієнтованих технологій у сільському господарстві.

Мета роботи - вивчити вплив фізико-хімічних параметрів на ріст культури *Streptomyces avermitilis*, щоб оптимізувати умови для максимального біосинтезу активних сполук, які входять до складу біостимулятора Регоплант.

Для досягнення поставлених цілей у експериментальних дослідженнях застосовувались **методи**, що є типовими для біотехнологічної практики, а саме: мікробіологічні методи культивування й контролю асептики, спектрофотометричний метод для визначення титру клітин, біохімічні методи оцінки продукції метаболітів, а також статистична обробка результатів для верифікації надійності отриманих даних.

Кваліфікаційна робота була виконана на базі Міжвідомчого науково-технологічного центру «Агробіотех» НАН та МОН України, що дозволило провести дослідження в умовах, максимально наближених до виробничих, з використанням сучасного лабораторного обладнання та методичного забезпечення, що відповідає актуальним вимогам до проведення науково-практичних робіт у сфері мікробіології.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Значення мікроорганізмів у біотехнології сільського господарства

Сільськогосподарські системи прийнято поділяти на дві групи: стала та традиційна. Традиційний підхід, що базується на інтенсивних методах і агрохімікатах, прагне максимізувати виробництво, але часто ігнорує наслідки. Стійка система, навпаки, прагне акцентувати на збереженні природних ресурсів, здоров'я ґрунту та біорізноманіття, пропонуючи екологічно безпечні та економічно розвинуті методи [21].

Основними відмінностями в цих системах прийнято вважати їх результативність, тобто їх економічні та екологічні наслідки. Традиційний підхід забезпечує нам швидку фінансову вигоду, призводячи до деградації навколишнього середовища. У той час стійка система забезпечує довгострокову продуктивність та збереження цінних ресурсів. Основна мета сталого сільського господарства полягає в забезпеченні продуктивного співіснування людини і природи, що вимагає розуміння природних систем і їхньої ролі в екологічній рівновазі [21].

Мікроорганізми - переважно мікроскопічні живі організми, які поділяють на одноклітинних (мікоплазми, археї, актиноміцети, бактерії, синьо-зелені водорості, рикетсії) та багатоклітинних (гриби, водорості, найпростіші, дріжджі). Вони є основою багатьох біотехнологічних рішень, які спрямовані на забезпечення сталого розвитку галузі. Взамін шкідливим хімічним добривам і пестицидам все частіше використовують біодобрива, біопестициди і біоінсектициди, створені на основі мікроорганізмів. Як зазначено в дослідженні, використання таких препаратів допомагає не тільки в збереженні навколишнього середовища, але й значно підвищує родючість ґрунту, зменшуючи залежність від синтетичних речовин [17].

Вчені використовують ґрунтову мікробіоту для розробки біодобрив, і біопестицидів для сприяння росту рослин і боротьби з бур'янами, шкідниками, хворобами. Мікроорганізми, які живуть у ґрунті, допомагають рослинам

засвоювати більше поживних речовин. Рослини і ці мікроорганізми беруть участь у «переробці поживних речовин». Мікроби допомагають рослині «засвоювати» необхідні джерела енергії. Натомість рослини віддають свої відходи побічними продуктами, щоб мікроби мали можливість використовувати їх у їжу [17].

Фосфор та азот, беззаперечно, належать до числа ключових елементів, необхідних для повноцінного росту і розвитку рослин, однак, попри їхню наявність у природному середовищі, більшість рослин не спроможна безпосередньо засвоювати ці елементи у формі, в якій вони існують у ґрунті. Фосфор відіграє суттєву роль у стійкості культур до стресу чи зрілості, а також у фіксації азоту прямо або ж опосередковано. Гриб *Penicillium bilaii* сприяє вивільненню фосфору з ґрунту. Він виробляє органічну кислоту, яка розчиняє фосфор у ґрунті, щоб корені могли його засвоювати. *Rhizobium* – азотфіксуюча бактерія, яка живе на коренях рослин у спеціальних клітинних утвореннях, які називаються кореневими вузликами. Ці вузлики мають здатність поглинати азот з повітря та перетворювати його в органічну форму, яка є придатною для використання рослинами [17].

У ширшому контексті слід наголосити, що мікроорганізми виступають одними з головних рушіїв переходу аграрного сектору до концепції сталого розвитку, оскільки саме завдяки мікробним технологіям стає можливим підвищення ефективності використання таких обмежених природних ресурсів, як вода й енергія, що своєю чергою зменшує антропогенне навантаження на довкілля. Вони забезпечують підтримання кругообігу поживних речовин, сприяють біологічній активності ґрунту та формуванню його родючості, що є фундаментальним чинником для довготривалого збереження продуктивності агроєкосистем [21].

Ще один надзвичайно важливий аспект, який вартий особливої уваги в умовах сучасних кліматичних викликів, полягає в тому, що мікроорганізми можуть відігравати суттєву роль у пом'якшенні наслідків змін клімату. Їхня здатність до фіксації вуглецю, а також до зниження рівня емісії парникових газів

- зокрема метану й оксидів азоту, які належать до найпотужніших кліматоактивних газів - надає можливість інтегрувати їх у сільськогосподарські технології як один із засобів боротьби з глобальним потеплінням. За даними окремих досліджень, саме завдяки використанню мікроорганізмів у практиці землеробства можна досягти зменшення обсягів викидів цих сполук, що відкриває нові перспективи для розвитку екологічно збалансованого агровиробництва [21].

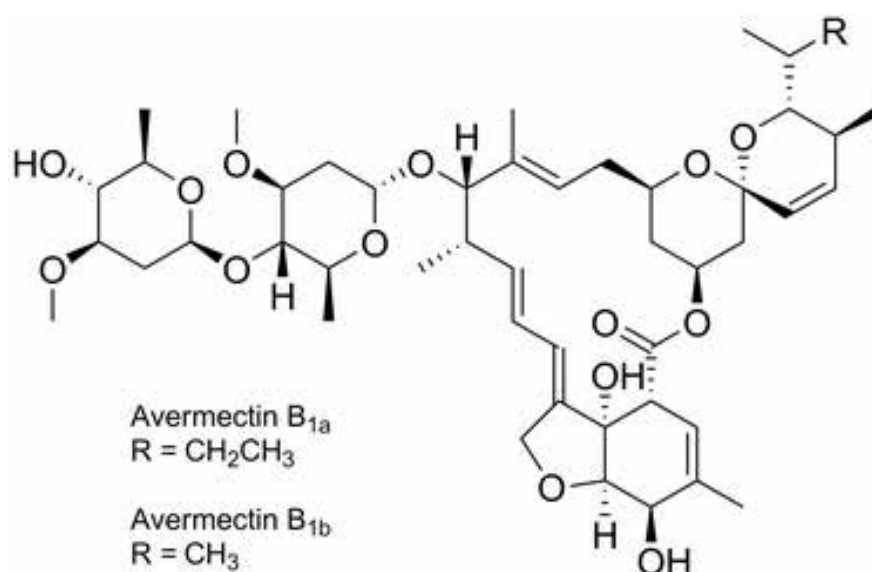
Грунтуючись на всебічному аналізі сучасної наукової літератури, можна зробити висновок, що ґрунтові мікроорганізми, завдяки надзвичайно складному й багатогранному метаболізму, виконують низку ключових функцій у формуванні біологічного потенціалу агроценозів: від трансформації органічних сполук і мінералізації поживних елементів до реалізації антагоністичних взаємодій із фітопатогенами та стимуляції росту культур. Усе це в комплексі формує надійне підґрунтя для розробки ефективних, біологічно безпечних та довготривало життєздатних технологій ведення сільського господарства.

1.2. Характеристика та особливості культивування *Streptomyces avermitilis*

Представники роду *Streptomyces*, зокрема *Streptomyces avermitilis*, належать до найбільш поширеної та екологічно значущої групи мікроорганізмів, які у свою чергу виконують вагомую роль у процесах біохімічної трансформації органічних речовин у ґрунті, забезпечуючи цим формування його біологічної активності та родючості. Відомо, що стрептоміцети здатні ефективно розкладати різноманітні складні органічні сполуки, чим здатні забезпечувати кругообіг речовин у природі. Рід *Streptomyces*, який належить до родини *Streptomycetaceae* порядку *Actinomycetales*, є надзвичайно численним і представлений приблизно 600 описаними видами, кожен з яких характеризується високою метаболічною активністю та біотехнологічним потенціалом [26].

Особливу наукову та промислову зацікавленість цей рід викликає завдяки здатності продукувати вторинні метаболіти, серед яких переважають антибіотики, активні щодо різних типів патогенних мікроорганізмів, включаючи мікроскопічні гриби, бактеріальні, а також пухлинні клітини. Статистично доведено, що близько 90% всіх відомих антибіотиків природного походження було вперше ізольовано саме з представників *Streptomyces sp.*, що підкреслює виняткову роль цього роду в розвитку фармацевтичної промисловості [26].

Серед великої кількості представників роду *Streptomyces*, особливе місце займає *Streptomyces avermitilis* - вид, який має виключне біотехнологічне значення, зокрема через здатність до синтезу унікальних біологічно активних речовин - антибіотиків авермектинового ряду. Ці речовини характеризуються широким спектром дії, що охоплює інсектицидні, акарицидні та нематоцидні властивості, що дозволяє успішно застосовувати їх у ветеринарії, сільському господарстві та медицині. З хімічної точки зору, авермектини належать до класу 16-членних макролідів, які мають характерну для цього класу будову: у



положенні C13 розташований дисахарид, утворений залишками L-олеандрози (2,6-дидезокси-3-О-метил-L-арабіногексози), що додає сполукам специфічних фізико-хімічних властивостей [26].

Рис 1.1 Молекулярна структура авермектинів [26]

Культура-продуцент *S. avermitilis* здатна синтезувати складний комплекс з восьми біологічно активних авермектинів, серед яких чотири компоненти

вважаються мажорними (A1a, A2a, B1a, B2a), а решта чотири - мінорними (A1b, A2b, B1b, B2b). Така хімічна різноманітність обумовлює широкий спектр біологічної активності та дозволяє створювати ефективні препарати для боротьби з різними типами шкідників. Крім того, на основі природних авермектинів було розроблено напівсинтетичний препарат - івермектин, який являє собою суміш авермектинів B1a та B1b, модифікованих шляхом гідрогенізації в положеннях 22 і 23 [26], що дозволяє підвищити стабільність та ефективність кінцевого продукту.

З точки зору морфології та фізіології, *Streptomyces avermitilis* є типовим представником свого роду, тобто грампозитивним, аеробним, споровоутворюючим мікроорганізмом, який формує добре розгалужений ниткоподібний міцелій. Його здатність утворювати спори дозволяє тривалий час виживати в несприятливих умовах довкілля. Міцелій цього виду активно розвивається як на твердих, так і на рідких поживних середовищах, зазвичай при температурному діапазоні від 20°C до 30°C, що є оптимальним для росту та метаболічної активності бактерії. За умов зниженого вмісту кисню в середовищі спостерігається більш інтенсивний розвиток міцелію, що свідчить про здатність *S. avermitilis* адаптуватися до різних умов культивування. З фізіологічного боку ця бактерія демонструє широкий спектр метаболічної активності, зокрема вона здатна використовувати як джерела вуглецю і енергії різноманітні органічні сполуки, включаючи вуглеводи, ліпіди та інші полімерні речовини. Завдяки високій активності ферментативних систем, бактерія може ефективно розщеплювати навіть такі складні органічні полімери, як целюлоза та лігнін, що забезпечує її успішне існування в ґрунтових екосистемах та підвищує її біотехнологічну цінність [12].

Окрім здатності до біодеградації та синтезу авермектинів, *Streptomyces avermitilis* також виявляє потенціал у сфері агробіотехнологій завдяки здатності синтезувати регулятори росту рослин. Дослідження показали, що деякі вторинні метаболіти цього виду мають ростостимулюючу дію, що пов'язано з утворенням індольних сполук, які можуть впливати на гормональну регуляцію рослинних

клітин. Завдяки цьому, *S. avermitilis* здатен стимулювати ріст і розвиток рослин, особливо в умовах стресу, таких як нестача вологи чи дефіцит мінерального живлення. Така активність робить можливим використання метаболітів бактерії для створення екологічно безпечних біопрепаратів, які можуть слугувати альтернативою традиційним хімічним добривам. У зв'язку з цим, застосування *S. avermitilis* у сільському господарстві сприяє не лише підвищенню врожайності, але й має позитивний екологічний ефект, оскільки дозволяє знизити антропогенне навантаження на ґрунтові екосистеми [12].

Процес культивування мікроорганізмів, без перебільшення, становить одну з ключових основ сучасної біотехнології, оскільки саме завдяки чітко налагодженому та науково обґрунтованому підходу до організації цього процесу відкривається можливість керованого, ефективного та відтворюваного отримання широкого спектра біологічно активних сполук — до яких належать не лише ферменти та антибіотики, а й вітаміни, амінокислоти, органічні кислоти, а також різноманітні первинні та вторинні метаболіти, що мають прикладне значення як у медичній, так і в сільськогосподарській, харчовій та хімічній галузях.

Серед усього комплексу чинників, що впливають на процес культивування мікроорганізмів, особливої уваги заслуговує температурний режим, оскільки саме він безпосередньо визначає функціональну активність клітинних ферментативних систем, від яких, у свою чергу, залежить інтенсивність перебігу основних метаболічних і біохімічних процесів усередині мікроорганізму. Відомо, що залежно від температурних уподобань мікроорганізми поділяються на психрофіли, які розвиваються за температур нижче 20 °С, мезофіли, що демонструють оптимальний ріст у межах 30–40 °С, і термофіли, яким властива життєдіяльність при температурах вище 45 °С. Наприклад, представники мезофільної мікрофлори, серед яких добре вивчена *Escherichia coli*, мають найсприятливіші умови розвитку за температури близько 37 °С. У випадках зниження температури спостерігається гальмування активності ферментних систем, тоді як її надмірне підвищення нерідко призводить до денатурації

білкових структур та незворотного порушення життєдіяльності клітини [11]. Тому точне дотримання температурного режиму, з урахуванням специфіки конкретного мікроорганізму, дає змогу істотно підвищити ефективність біопроецесу, скоротити його тривалість та знизити енергетичні витрати на регулювання температури. Деякі дослідження також засвідчують, що циклічні коливання температурного фону можуть сприяти інтенсифікації синтезу вторинних метаболітів, що особливо важливо в процесі біосинтезу антибіотиків.

Ще одним фундаментальним параметром середовища культивування є рН, від якого значною мірою залежить активність ферментів та стабільність клітинних структур. Оптимальні значення рН, як правило, варіюють у межах 6,5-7,5 для більшості бактерій, тоді як гриби здатні витримувати більш кислі умови, зокрема рН від 4 до 6. Невідповідність рівня кислотності спричиняє не лише зниження активності ферментів, але й порушення транспорту сполук через клітинну мембрану, що зрештою гальмує ріст популяції. Щоб уникнути подібних наслідків, у середовище культивування вводять буферні системи (наприклад, фосфатні або цитратні), які дозволяють стабілізувати рН протягом усього періоду ферментації. Підтримка постійного рН також важлива для зменшення фізіологічного стресу, викликаного коливаннями кислотності, що можуть провокувати зниження життєздатності клітин [10].

У разі культивування аеробних мікроорганізмів надзвичайно важливою умовою є забезпечення належної аерації, оскільки доступ до кисню визначає ефективність клітинного дихання та продуктивність біосинтезу. Для цього у біореакторах застосовуються різні технічні рішення: від механічного перемішування, що сприяє кращому змішуванню фаз, до введення повітря за допомогою дрібнопористих дифузорів, які створюють мікропухирці та значно збільшують площу контакту між газовою і рідкою фазами. Використання мішалок (лопатевих, пропелерних тощо) дозволяє не тільки інтенсифікувати розподіл кисню, але й запобігати утворенню зон з низьким вмістом кисню, що могло б негативно вплинути на однорідність популяції. Ще одним ефективним способом є застосування газопроникних полімерних мембран, через які кисень

поступово дифундує у середовище, що особливо актуально при роботі з культурами, чутливими до механічного впливу [14]. Для анаеробних організмів, таких як метаногени, навпаки, необхідно створити умови з мінімальним вмістом кисню, адже навіть його незначна присутність може інгібувати функціонування ключових ферментів метаболічних шляхів. Гнучке управління рівнем аерації дозволяє створювати оптимальні умови для різних типів мікроорганізмів, одночасно запобігаючи накопиченню токсичних побічних продуктів [10].

Не менш важливим чинником, що визначає інтенсивність росту і біосинтезу, є доступність джерел вуглецю й азоту - елементів, які лежать в основі синтезу клітинних структур, ферментів, нуклеїнових кислот тощо. Як правило, вуглець забезпечується у вигляді глюкози, крохмалю або інших вуглеводів, тоді як азот надходить з амонійних солей, сечовини чи органічних залишків. Пропорція між цими елементами, відома як співвідношення C:N, відіграє вирішальну роль у регуляції метаболізму: при високому вмісті вуглецю зазвичай спостерігається накопичення біомаси, тоді як зменшення цього показника стимулює синтез вторинних метаболітів, зокрема антибіотиків [8]. У контексті економічної ефективності виробництва дедалі більше уваги приділяється використанню доступних відходів агропромислового виробництва - таких як меляса або кукурудзяна барда, які, окрім зниження собівартості процесу, дозволяють також зменшити екологічне навантаження [8].

Також варто згадати про важливість перемішування культурального середовища, яке забезпечує не лише рівномірний розподіл поживних речовин та кисню, але й ефективне відведення тепла. Невідповідна швидкість перемішування може спричинити як надмірний механічний вплив, що пошкоджує клітини з делікатною клітинною стінкою, так і утворення «мертвих зон», де відбувається локальне виснаження середовища або накопичення токсичних сполук. Турбулентний режим циркуляції може стимулювати ріст деяких культур, однак потребує точного контролю інтенсивності, особливо у випадках чутливих мікроорганізмів [10].

Ретельне й глибоке вивчення впливу ключових середовищних чинників — зокрема таких, як температурний режим, кислотно-лужний баланс (pH) та якісний і кількісний склад живильного середовища — на фізіолого-біохімічні процеси, що відбуваються в мікроорганізмах упродовж їхньої життєдіяльності, дає підстави стверджувати, що саме ці параметри мають вирішальне значення на етапі проектування ефективної біотехнологічної стратегії. Їхній вплив проявляється у здатності як активізувати, так і пригнічувати синтез вторинних метаболітів — сполук, що нерідко мають високу практичну цінність і використовуються в медицині, сільському господарстві та промисловості.

1.3. Перспективи використання біостимуляторів у сільському господарстві

У сучасному аграрному виробництві, на тлі глобального потепління, деградації ґрунтів та забруднення довкілля пестицидами й мінеральними добривами, дедалі більшої актуальності набуває пошук стійких, екологічно безпечних альтернатив традиційним агрохімікатам, і саме в цьому контексті біопрепарати, створені на основі життєдіяльності мікроорганізмів, розглядаються як перспективний інструмент для підвищення врожайності, захисту рослин і рекультивації деградованих або забруднених екосистем [16]. Окрім того, що ці біологічні агенти сприяють більш гармонійному розвитку рослин, вони також демонструють здатність знижувати екологічні ризики, пов'язані з появою у навколишньому середовищі резистентних до хімічних засобів захисту штамів фітопатогенів, що особливо важливо з точки зору біобезпеки.

Ключовим напрямом використання біостимуляторів є прискорювання росту рослин, що досягається за рахунок складної взаємодії мікроорганізмів із кореневою системою культур. Окремо заслуговують на увагу вітчизняні

біостимулятори нового покоління, серед яких важливе місце посідають препарати «Стимпо» та «Біочар», розроблені та апробовані компанією «Агробіотех» - ці засоби створені на основі живих мікроорганізмів та продуктів їхньої життєдіяльності, збагачені фітогормонально активними метаболітами, мікроелементами та природними антиоксидантами, що у комплексі забезпечує пролонговану стимулюючу дію на ріст і розвиток сільськогосподарських культур, активізує кореневу систему, покращує мікробний баланс у ризосфері та підвищує здатність рослин до адаптації в умовах абіотичного стресу, зокрема дефіциту вологи, температурних коливань і мінерального голодування, що робить ці препарати ефективним інструментом для інтенсивного, але водночас сталого землеробства [1].

Серед найбільш поширених у сільському господарстві азотфіксуючих бактерій, які використовуються для збагачення ґрунтів, особливо під час вирощування бобових культур, слід згадати представників родів *Rhizobium* та *Azospirillum*, здатних формувати ефективні симбіотичні зв'язки з рослинами та забезпечувати їх легкозасвоюваними формами азоту, що дозволяє істотно знизити потребу у використанні хімічних азотних добрив і, відповідно, зменшити антропогенне навантаження на агроєкосистеми [29].

У контексті зменшення використання пестицидів та мінеральних добрив також заслуговує на увагу впровадження ентомопатогенних мікроорганізмів у практику сільського господарства, оскільки їх застосування сприяє підвищенню стійкості культур до шкідників, зменшенню загального рівня хімічного навантаження на ґрунти, а також сприяє створенню сприятливих умов для розвитку корисної мікрофлори; згідно з результатами досліджень, інокуляція насіння пшениці біопрепаратами дозволяє досягти підвищення врожайності на рівні 15-25% [29]. Водночас ці препарати можуть пом'якшувати вплив

абіотичних стресів, таких як засоленість ґрунтів чи посухи, що особливо актуально у зв'язку з кліматичними змінами.

Ряд ґрунтових бактерій, зокрема *Pseudomonas fluorescens*, продемонстрував здатність активізувати ріст культур завдяки покращенню аерації ризосфери та стимуляції утворення фітогормонів, що в комплексі сприяє підвищенню урожайності на 10–20%, при цьому покращуючи мікробіологічну активність ґрунту [14]. Така багатофакторна дія біопрепаратів робить їх універсальним і перспективним засобом для сталого землеробства.

Одним із найбільш дієвих методів захисту рослин від патогенів є використання біофунгіцидів на основі антагоністичних мікроорганізмів, таких як *Bacillus subtilis*, що здатний ефективно пригнічувати розвиток широкого спектра збудників грибкових захворювань, включаючи фузаріоз, паршу та альтернаріоз, завдяки синтезу антибіотикоподібних речовин і конкурентному витісненню патогенів із екологічної ніші [14].

Ентомопатогенні біопрепарати не лише забезпечують знищення шкідників, а й здатні активізувати в рослинах механізми індукованої системної резистентності, що дозволяє культурі самостійно протистояти атакам патогенів; такі мікроорганізми також виділяють антимікробні метаболіти й ферменти, які руйнують клітинні стінки грибів - прикладом цього є *Trichoderma harzianum*, що продукує ферментативні комплекси для розщеплення патогенів [28]; [6]; [20].

Застосування мікроорганізмів також є ефективним інструментом у біоремедіації - відновленні екосистем, забруднених важкими металами, нафтопродуктами та іншими токсикантами: Згідно з результатами наукових досліджень, окремі штами таких мікроорганізмів, як *Pseudomonas putida* та *Acinetobacter*, демонструють високий рівень здатності до біодеградації органічних забруднювачів, що відкриває шлях до ефективної детоксикації як ґрунтових, так і водних екосистем [20].

Поряд з цим, важливим компонентом екологічно збалансованого сільського господарства є впровадження біопрепаратів на основі мікоризоутворюючих грибів — зокрема таких, як *Glomus intraradices*, здатних утворювати у ґрунті складну й добре розгалужену мережу гіфальних структур. Це мікроскопічне утворення не лише сприяє фізичному поліпшенню ґрунтової структури, а й істотно підвищує рівень доступності макро- і мікроелементів для рослинних кореневих систем, що набуває особливої ваги в умовах дефіциту води або обмеженої кількості мінеральних ресурсів у ґрунті [24].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Обладнання та організація біотехнологічної лабораторії в МНТЦ «Агробіотех»

Забезпечення ефективного й безпечного культивування мікроорганізмів, зокрема штаму *Streptomyces avermitilis*, передбачає створення належних лабораторних умов, у яких особлива увага приділяється дотриманню асептики, контролю за параметрами мікроклімату та точному функціонуванню відповідного технологічного обладнання. У контексті мікробіологічних досліджень ключову роль відіграє високий рівень стерильності приміщень, тому ще на етапі проектування лабораторії необхідно враховувати вимоги до матеріалів, з яких виготовлені стіни, підлога та інші поверхні: вони мають бути стійкими до регулярної дезінфекції, легко очищуваними та такими, що не утворюють мікротріщин, де могли б накопичуватися контамінанти. Відповідно до міжнародних норм біобезпеки, мікробіологічна лабораторія, в якій проводиться робота з актиноміцетом *S. avermitilis*, повинна бути класифікована принаймні на рівень біобезпеки BSL-1, а при роботі з генетично модифікованими або рекомбінантними штамми - BSL-2 [23].

З точки зору внутрішньої організації простору, лабораторія повинна бути логічно поділена на низку функціональних зон, кожна з яких виконує чітко визначені завдання в загальному технологічному процесі. Першочергово необхідно обладнати зону підготовки, у якій проводиться приготування поживних середовищ, розчинів та інших реагентів, що включає використання магнітних мішалок, ваг, дозаторів і термостійкого посуду. У цій же зоні здійснюється автоклавування - один із найважливіших етапів забезпечення стерильності. Обов'язковою є також наявність ізольованої асептичної зони, у якій проводиться маніпуляція з культурами мікроорганізмів; ця зона повинна бути оснащена ламінарним боксом класу II, що забезпечує потік очищеного повітря, фільтрованого через HEPA-фільтри, для запобігання потраплянню сторонніх частинок і мікроорганізмів до робочого простору [23].

Для безпосереднього культивування мікроорганізмів має бути передбачена окрема інкубаційна кімната, в якій розміщуються інкубатори, здатні підтримувати стабільну температуру в діапазоні 28-30°C з похибкою не більше $\pm 0,5^\circ\text{C}$, а також контроль вологості й, у разі необхідності, рівня аерації. Надзвичайно важливим є обладнання зони зберігання та аналітики: саме тут проводиться спостереження за морфологічними та фізіологічними змінами культур, а також аналіз отриманих біомас і метаболітів. У цій зоні розміщуються мікроскопи, спектрофотометри, морозильні камери (для коротко- та довгострокового зберігання штамів при -80°C), а також обладнання для ліофілізації, що дозволяє стабілізувати та зберігати мікроорганізми у висушеному стані без втрати життєздатності [18].

До переліку основного обладнання, яке необхідне для забезпечення повноцінного функціонування біотехнологічної лабораторії, передусім належать ламінарні шафи класу II, які створюють контрольований стерильний простір за рахунок вертикального або горизонтального потоку повітря, очищеного за допомогою HEPA-фільтрів; саме це обладнання гарантує мінімізацію ризиків мікробної контамінації під час маніпуляцій з *Streptomyces avermitilis*. Автоклав, як уже зазначалося, відіграє ключову роль у стерилізації середовищ, інструментів, лабораторного посуду та відходів: режим стерилізації, що полягає в обробці паром при температурі 121°C та тиску 1 атмосфера протягом 15 хвилин, є стандартним і дозволяє досягти повної інактивації потенційно небезпечних мікроорганізмів. Крім стандартних інкубаторів, бажано також мати у наявності шейкер-інкубатори, які забезпечують динамічні умови культивування в рідких середовищах при швидкості обертання від 150 до 250 об/хв – така аерація сприяє ефективному росту нитчастого міцелію та продукції метаболітів [23].

У випадках масштабного культивування, зокрема при виробництві авермектинів у напівпромислових об'ємах, доцільним є використання біореакторів (ферментерів) об'ємом від 5 до 100 літрів, які мають бути оснащені системами регуляції рН, температури, та швидкості подачі повітря. Через високі

потреби *S. avermitilis* в оксигенації, обов'язковою є наявність ефективної системи аерації, яка включає барботажні насадки, газові ротаметри та систему подачі повітря або кисню під контролем. Для оцінки динаміки росту культури та моніторингу біомаси використовується спектрофотометр, налаштований на довжину хвилі 600 нм, що дозволяє визначити оптичну щільність суспензії та оцінити стадії росту мікроорганізмів у реальному часі. Після досягнення необхідної біомаси, її осадження здійснюється за допомогою високошвидкісної центрифуги, яка повинна працювати в діапазоні 10 000-15 000 обертів за хвилину, що є достатнім для ефективного осадження клітинної маси перед подальшою екстракцією вторинних метаболітів, наприклад авермектинів.

Для довготривалого зберігання ізольованих штамів застосовують або глибоке заморожування при -80°C , або ліофілізацію, що забезпечує збереження метаболічної активності мікроорганізмів протягом тривалого часу без необхідності постійного субкультивування. У процесі ферментації важливо постійно контролювати основні фізико-хімічні параметри середовища, тому лабораторія повинна бути обладнана рН-метром для моніторингу кислотності та аналізатором газової фази для контролю концентрації кисню, вуглекислого газу та інших газів, що можуть впливати на метаболізм мікроорганізмів [23].

Незважаючи на те, що *Streptomyces avermitilis* не є патогенним для людини у класичному розумінні, при тривалому контакті з його спорами чи міцелієм може виникати сенсibiliзація організму або алергічні реакції, зумовлені імунною відповіддю. Саме тому дотримання правил біобезпеки є обов'язковим для всіх співробітників лабораторії: вони повинні працювати в захисному одязі, включаючи лабораторні халати, маски та рукавички, а також проводити регулярну дезінфекцію робочих поверхонь за допомогою 70% етанолу або хлорвмісних дезінфекційних засобів (наприклад, хлоргексидину). Усі відходи біологічного походження повинні бути стерилізовані в автоклаві перед утилізацією з метою мінімізації екологічних ризиків. Для перевірки чистоти культури застосовують методи контролю контамінації: посіви на селективні середовища, мікроскопічну візуалізацію морфології колоній, а також

молекулярно-генетичні методи, зокрема ПЛР-аналіз, що дозволяє підтвердити ідентичність штаму [23].

2.2. Характеристика регулятора росту рослин «Регоплант»

У рамках дослідження, спрямованого на оптимізацію умов культивування *Streptomyces avermitilis* як продуцента біологічно активних метаболітів, особливу увагу було приділено характеристиці препарату Регоплант, до складу якого ці сполуки входять і який застосовується як ефективний біостимулятор у рослинництві.

Унікальність даного біостимулятора полягає в комплексному впливі на рослину, що досягається за рахунок поєднання продуктів мікробного синтезу, зокрема вторинних метаболітів, здобутих шляхом культивування корневих мікроміцетів женьшеню, та біологічно активних речовин, аналогічних за структурою з авермектином - сполукою, що відома своєю вираженою протипаразитарною дією. Така синергічна комбінація дозволяє здобути високоефективний препарат із багатокomпонентним механізмом дії на рівні клітинних, тканинних та системних процесів у рослинному організмі.

До складу Регопланту входить ретельно збалансований комплекс біологічно активних речовин, який включає аналоги природних фітогормонів, вільні амінокислоти, ненасичені жирні кислоти, біоактивні олігосахариди, хітозан, мікроелементи в хелатній формі, а також сполуки, що мають властивості біозахисту. Всі ці компоненти відіграють взаємодоповнюючу роль у регуляції фізіолого-біохімічних процесів у рослин, сприяючи їхньому повноцінному росту, стійкості до стресів та підвищенню імунітету. Зокрема, хітозан, як відомо з літературних джерел, стимулює синтез фітоалексинів і фітогормонів, а мікроелементи виконують роль кофакторів для ферментних систем, активізуючи численні метаболічні шляхи [1].

Стимулятор радять до застосування у широкому спектрі агрономічних і технологічних напрямів. Його ефективність підтверджена при передпосівній обробці насінневого матеріалу різних сільськогосподарських культур, зокрема

зернові, бобові, технічні та овочеві рослини. Крім того, біостимулятор можна використовувати для обприскування в період вегетації, що дозволяє коригувати розвиток рослин у залежності від фази росту та погодних умов. Застосування Регопланту є доцільним також у садівництві, ягідництві, овочівництві, у вирощуванні грибів, газонних трав, декоративних кущів і дерев, а також у лісовому господарстві. Широкий спектр застосування підтверджує універсальність препарату та його здатність адаптуватися до різних агроecosистем.

Фізіологічна дія препарату зумовлена, насамперед, активацією поділу клітин, стимуляцією коренеутворення (ризогенезу), посиленням розвитку симбіотичної мікрофлори в прикореневій зоні, активацією фотосинтетичних процесів, зокрема збільшенням площі листової поверхні, а також інтенсифікацією поглинання поживних речовин. У комплексі це забезпечує не лише швидший ріст і розвиток рослин, але й знижує ризики фітотоксичного впливу хімічних пестицидів. Крім того, Регоплант демонструє виражену біозахисну дію, що включає антимуутагенний ефект, захист від паразитичних організмів і стимулювання неспецифічного імунітету рослин. Згідно з інформацією від виробника, препарат здатний підвищити врожайність культур і покращити товарну якість отриманої продукції без негативного впливу на довкілля [1].

Зберігання препарату здійснюється в упаковці виробника при температурі не вище 30 °С у сухому, темному, добре вентильованому приміщенні. За дотримання рекомендованих умов термін придатності складає три роки.

Перед застосуванням біостимулятор готують у вигляді водного розчину, який змішують із іншими агрохімічними препаратами безпосередньо в день використання. Особливу увагу при приготуванні робочого розчину приділяють ретельному перемішуванню, оскільки ефективність препарату напряму залежить від рівномірності його розподілу в розчині - доза препарату, як правило, є невеликою, але концентраційно активною. Такий підхід гарантує максимальну

біодоступність активних компонентів і забезпечує рівномірне покриття оброблюваної поверхні або насіннєвого матеріалу [1].



Рис. 2.1 Біостимулятор росту рослин Регоплант (Агробіотех) [1]

У результаті аналізу доступної інформації можна стверджувати, що Регоплант є вдалим прикладом біологічного препарату нового покоління, в основі якого лежить взаємодія біоактивних компонентів з фізіологією рослини, що у підсумку забезпечує пролонгований ефект без необхідності використання агресивних хімічних речовин.

2.3. Приготування живильних середовищ

Більшість представників роду *Streptomyces*, згідно з численними експериментальними спостереженнями, характеризуються високою інтенсивністю росту на поживних середовищах, у складі яких глюкоза та сахароза виконують роль основних джерел вуглецевого живлення. Така закономірність свідчить про добре розвинені й функціонально активні метаболічні шляхи, спрямовані на ефективну утилізацію легкодоступних моно- та дисахаридів, що, своєю чергою, забезпечує високий рівень енергетичного забезпечення клітинних процесів. У контрасті до цього, використання середовища, де джерелом вуглецю виступає ксилоза, супроводжується помітно

нижчими темпами росту, що, ймовірно, пояснюється або недостатньою активністю ферментативних систем, відповідальних за метаболізм ксилози, або ж її меншою метаболічною доступністю для клітини *Streptomyces* у порівнянні з іншими цукрами [2].

У контексті даного дослідження, з метою створення оптимальних умов для росту, розвитку й продукування біологічно активних сполук досліджуваними мікроорганізмами, було проведено поетапне й ретельно контрольоване приготування низки варіантів живильних середовищ із чітко визначеним якісним і кількісним складом макро- та мікроелементів.

Агар Гаузе

Крохмаль 10,0 г

NaCl 0,5 г

MgSO₄·7H₂O 0,25 г

K₂SO₄ 0,25 г

K₂HPO₄ 0,25 г

NH₄NO₃ 0,5 г

Агар 10,0 г

Дистильована вода 0,5 л

Приготування агару Гаузе починають з розчинення крохмалю в дистильованій воді при постійному перемішуванні для запобігання утворенню грудок. До отриманого розчину додають необхідні мінеральні компоненти: хлорид натрію, сульфат магнію гептагідрат, сульфат калію, фосфат калію та нітрат амонію. Після повного розчинення солей у середовище додають 10,0 г агару та нагрівають до повного розчинення желуючого агента. Отримане середовище стерилізують в автоклаві при тиску 0,5–0,7 атм (температура 121°C) протягом 45 хвилин. Після стерилізації середовище охолоджують до 50–55°C та розливають у стерильні чашки Петрі для подальшого використання.

Баннетта агар (Bennett's agar)

Глюкоза 5 г

Пептон 0.5 г

Дріжджовий екстракт 0.5 г

Триптон 1 г

Агар 10 г

Дистильована вода 500 мл

Агар Баннетта готують шляхом розчинення у дистильованій воді основних поживних компонентів, зокрема глюкози як джерела вуглецю, пептону, дріжджового екстракту та триптону як джерел азоту і ростових факторів. Після рівномірного перемішування додають 10,0 г агару та нагрівають розчин до повного розчинення всіх компонентів, після чого середовище стерилізують при температурі 121°C і тиску 1 атм протягом 20 хвилин. Стерильне середовище охолоджують до 50-55°C і розливають у стерильні чашки Петрі.

Серед запропонованих варіантів найбільш відповідним є агар Гаузе, оскільки його склад забезпечує умови, наближені до природного середовища існування стрептоміцетів.

Основним джерелом вуглецю у наведеному середовищі є крохмаль, який засвоюється поступово, що сприяє стабільному розвитку культури. Це особливо важливо, оскільки швидко засвоювані джерела вуглецю, наприклад, глюкоза, можуть призводити до надмірного накопичення первинних метаболітів, що гальмують подальший ріст клітин. Наявність необхідних мінералів, таких як сульфати магнію і калію, а також фосфати, сприяє підтриманню балансу іонів, що є ключовим для процесів біосинтезу.

Ще одним аргументом на користь цього середовища є те, що його рН підтримується на рівні $7,2 \pm 0,2$, що відповідає оптимальному діапазону для більшості стрептоміцетів. Занадто лужне середовище може негативно впливати на процеси морфогенезу та синтез вторинних метаболітів. Крім того, саме в

умовах агару Гаузе стрептоміцети демонструють повний цикл розвитку – від утворення субстратного міцелію до формування спор.

На основі агару Гаузе, спільно з командою Міжвідомчого науково-технологічного центру НАН та МОН України було розроблено модифіковане середовище. До його складу було додано мікро і макроелементи, за яких культура *S. avermitilis* покращила метаболічну активність.

Склад мікро- та макроелементів для поживного середовища:

D-глюкоза 5,00 г

Калій фосфорнокислий однозаміщений (KH_2PO_4) 0,45 г

Калій фосфорнокислий двозаміщений (K_2HPO_4) 0,15 г

Марганець (II) сірчанокислий 5-ти водний ($\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,01 г

Мідь (II) сірчанокисла (5-ти водна $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,01 г

Залізо (II) сірчанокисле 7-ми водне ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,01 г

Магній сірчанокислий 7-ми водний ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,10 г

Калій сірчанокислий (K_2SO_4) 0,05 г

L-аспарагінова кислота ($\text{L-C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$) 0,01 г

Використання крохмалю забезпечує поступове вивільнення глюкози в процесі ферментативного розщеплення, що сприяє рівномірному росту культури без різких коливань концентрації субстрату. Такий підхід дозволяє підтримувати стабільний метаболізм мікроорганізму протягом усього періоду культивування, що впливає на біосинтез вторинних метаболітів. Джерелом вуглецю слугує D-глюкоза, яка легко засвоюється клітинами мікроорганізму та забезпечує швидкий старт росту.

Окрім джерела вуглецю, до середовища було додано нітрат амонію, який є постачальником азоту, необхідного для біосинтезу амінокислот, білків та нуклеотидів. Для підтримки стабільного рН середовища та забезпечення клітин фосфором використовується буферна система на основі калій фосфорнокислого у двох формах - однозаміщеній (KH_2PO_4) і двозаміщеній (K_2HPO_4). Таке

поєднання запобігає різким змінам кислотності середовища, що негативно впливає на активність ферментів, відповідальних за ріст і розвиток мікроорганізму.

Для регуляції іонного балансу середовище збагачено сульфатами магнію і калію. Іони магнію беруть участь у ферментативних реакціях, особливо у процесах енергетичного обміну, тоді як калій сприяє підтримці осмотичного тиску та активному транспорту метаболітів через клітинну мембрану.

Крім макроелементів, до складу середовища включено мікроелементи - сульфати заліза, марганцю та міді, які необхідні для функціонування ферментних систем. Залізо бере участь в окисно-відновних реакціях, марганець виконує регуляторну функцію, впливаючи на активність антиоксидантних ферментів, а мідь необхідна для синтезу деяких оксидаз та інших ферментів, залучених у біосинтез вторинних метаболітів.

Особливістю середовища є включення L-аспарагінової кислоти, яка виступає додатковим джерелом азоту, а також бере участь у циклі трикарбонових кислот, що сприяє активному росту культури та покращенню її фізіологічного стану.

Процес приготування середовища розпочинається з розчинення крохмалю та D-глюкози у дистильованій воді при постійному перемішуванні. Оскільки крохмаль має властивість утворювати грудки, його додавання відбувається поступово, щоб забезпечити рівномірний розподіл у рідині. Після утворення однорідної суспензії додають макроелементи - калій фосфорнокислий, нітрат амонію, сульфат магнію та сульфат калію. Кожен компонент ретельно розчиняють шляхом перемішування, щоб уникнути утворення нерозчинних осадів.

Наступним етапом є додавання мікроелементів, зокрема сульфату заліза, сульфату марганцю та сульфату міді. Оскільки ці сполуки можуть утворювати осад при високій концентрації, їх попередньо розчиняють у невеликій кількості дистильованої води та додають у середовище поступово. Далі додається L-

аспарагінова кислота, яка легко розчиняється у воді й одразу вступає у біохімічні реакції після початку культивування.

Остаточний етап приготування включає стерилізацію середовища в автоклаві при температурі 121°C і тиску 1 атм протягом 45 хвилин. Після стерилізації середовище охолоджують до 50-55°C у стерильних умовах. Контроль стерильності здійснюється шляхом інкубації контрольних зразків за 37°C протягом 24 годин для перевірки відсутності сторонньої контамінації.

У межах дослідження особливу увагу було приділено експериментальній перевірці впливу значень рН у діапазоні від 6.0 до 9.0, що дозволило визначити межі фізіологічно прийнятних умов для росту культури на поживних середовищах.

Під час приготування кожної варіації середовища значення рН коригували одразу після розчинення поживних компонентів, але ще до стерилізації, щоб уникнути термічної деградації буферів. Для досягнення необхідного рівня кислотності використовували розчини 1М HCl або 1М NaOH, додаючи їх поступово при постійному контролі за допомогою електронного лабораторного рН-метра. Особливу увагу було приділено калібруванню приладу перед кожним вимірюванням з використанням стандартних буферних розчинів із рН 4.00, 7.00 та 9.00, що дозволяло уникнути похибок при роботі в широкому інтервалі кислотності.

Отримані варіанти середовища зі значеннями рН 6.0; 6.5; 7.0; 7.5; 8.0; 8.5 та 9.0 стерилізували стандартним способом - в автоклаві при температурі 121 °C протягом 20 хвилин, після чого охолоджували до 50–55 °C і розливали в стерильні чашки Петрі. Варто зазначити, що після автоклавування рН кожної проби було повторно перевірено, оскільки термічна обробка могла впливати на кислотність через гідроліз солей та зміну буферної ємності. У разі потреби проводили додаткову корекцію шляхом внесення невеликих об'ємів стерильних розчинів кислот або лугів, після чого середовище додатково витримували для стабілізації параметрів.

2.4. Морфологічна оцінка досліджуваного штаму *Streptomyces avermitilis*

Штам *Streptomyces avermitilis* AV-10 є високопродуктивним мутантом, отриманим із природного ізоляту *S. avermitilis*, що демонструє здатність синтезувати авермектини - макроциклічні лактонові сполуки з антипаразитарною активністю. Цей штам був ідентифікований у 1990-х роках у ґрунтових пробах і згодом досліджувався у зв'язку з його метаболічним потенціалом.

Морфологічні характеристики *S. avermitilis* AV-10 відповідають типовим особливостям роду *Streptomyces*. Колонії округлі, 7-10 мм у діаметрі при культивуванні протягом 10-14 діб. Повітряний міцелій має сіруватий або сіро-коричневий колір, а субстратний міцелій змінюється від безбарвного до світло-коричневого відтінку. Утворення розчинного пігменту незначне або відсутнє, що залежить від складу поживного середовища. Характерною особливістю є формування спорових ланцюжків, які можуть містити до 50 спор.

Streptomyces avermitilis AV-10 є типовим представником облигатно аеробних актиноміцетів, що відзначається винятковою ферментативною активністю й широкими метаболічними можливостями, зумовленими його генетичною та регуляторною пластичністю. Характерною рисою цього штаму є активне гідролізування таких полімерів, як крохмаль і казеїн, що свідчить про наявність ефективно функціонуючих амілаз і протеаз у складі його ферментативного апарату, при цьому здатність до розщеплення целюлози відсутня, ймовірно, через обмежену експресію або відсутність необхідних целюлазних систем. Що стосується вуглецевого метаболізму, то *S. avermitilis* AV-10 здатен засвоювати низку легко доступних цукрів - таких як глюкоза, фруктоза, мальтоза та лактоза - що вказує на універсальність і гнучкість його катаболічних шляхів. Для повноцінного росту та розвитку він також потребує джерел азоту у формі амонійних солей або органічних сполук, зокрема пептону чи дріжджового екстракту, що забезпечують не лише азот, а й інші поживні компоненти, необхідні для анаболізму.

Водночас синтез авермектинів у цього штаму відбувається через добре вивчений полікетидний шлях, що є результатом послідовного приєднання малоніл-КоА одиниць до розвиваючогося ланцюга, в результаті чого утворюється макроциклічний лактон - основа біологічно активної молекули. Центральним регулятором цього процесу є транскрипційний активатор AveR, який ініціює експресію кластеру генів, що кодують полікетидсинтазний комплекс. Саме ця система функціонує як динамічна регуляторна мережа, здатна реагувати на рівень проміжних метаболітів і, відповідно, коригувати активність біосинтетичних ферментів, що дає змогу тонко контролювати вихід кінцевого продукту [15].

З-поміж інших прокариотичних організмів *S. avermitilis* вирізняється нетиповою, лінійною організацією геному, що надає йому низку унікальних переваг у контексті регуляції генетичної експресії. Ця лінійна ДНК містить численні кластери, відповідальні за синтез вторинних метаболітів, включаючи авермектини, олігоміцини та інші сполуки з біологічною активністю, що розширює біотехнологічний потенціал організму. Дослідження показали, що за зміни таких зовнішніх параметрів, як температура чи кислотність середовища, відбувається активація специфічних промоторів, що регулюють транскрипцію відповідних генів у біосинтетичних кластерах. Така здатність до динамічної перебудови транскрипційного ландшафту забезпечує адаптивність клітинної метаболічної системи до умов навколишнього середовища [26].

Біосинтез авермектинів регулюється складною мережею генів, що включає ферменти полікетидного синтазного комплексу, а також допоміжні фактори, що відповідають за ефективність синтезу. Дослідження показали, що змінюючи експресію регуляторних білків, можна модулювати рівень продукції авермектинів. Генетичні модифікації *S. avermitilis* дозволили створити мутантні варіанти із покращеними характеристиками біосинтезу, що має велике значення для біотехнологічних виробничих процесів.

У ході проведення *in vitro* досліджень за допомогою методики подвійного посіву на селективних середовищах встановлено, що культура *S. avermitilis*

ефективно інгібує ріст широкого спектра фітопатогенних грибів, включаючи *Fusarium culmorum*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, а також менш чутливих до дії природних антибіотиків представників, таких як *Sclerotinia sclerotiorum* та *Rhizoctonia solani*. При цьому, характерною особливістю антагоністичного впливу штаму є утворення чітко окреслених зон інгібування з діаметром від 18 до 35 мм, що спостерігалось на середовищах Чапека та PDA після 72 годин інкубації при температурі 28°C. Окремо слід відзначити здатність цього штаму до виділення термостабільних метаболітів, які зберігали свою активність навіть після автоклавування культуральної рідини, що свідчить про наявність у його метаболомі сполук не лише пептидної природи, але й макроциклічних лактонів, структурно подібних до авермектинів [2].

Біохімічний аналіз вторинних метаболітів дозволив ідентифікувати декілька фракцій, що проявляють активність проти грамнегативних бактерій, зокрема *Pseudomonas syringae* та *Xanthomonas campestris*, а також грампозитивних представників, таких як *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*, що є відомими фітопатогенами. У порівнянні з іншими штамами *S. avermitilis*, активність проти бактерій проявлялася не лише у вигляді прямого пригнічення росту, але й шляхом зміни морфології колоній патогенів, що вказує на можливу дію сигнальних метаболітів або інгібіторів біоплівкоутворення. Показово, що при проведенні експериментів з ко-культивуванням *P. syringae* у рідкому середовищі було виявлено зниження росту патогена на понад 65% протягом перших 48 годин, що значно перевищує показники, зареєстровані для штамів УКМ Ас-2179 та ІМВ Ас-5015 у аналогічних умовах [13].

Особливе місце в характеристиці антагоністичного потенціалу штаму *S. avermitilis* AV-10 займає його нематоцидна активність. Проведені біотести з використанням личинок другого віку *Meloidogyne incognita* та *Heterodera schachtii* показали, що культуральна рідина AV-10 спричиняла летальний ефект у понад 95% особин протягом 24 годин. Варто наголосити, що навіть при розведенні 1:5 з водою активність залишалась високою (понад 80% загиблених нематод), що підтверджує концентраційну ефективність синтезованих

метаболітів. Крім того, при сумісному використанні екстрактів AV-10 із сублетальними дозами авермектинів спостерігався синергетичний ефект, що проявлявся у пришвидшенні настання паралічу личинок вже через 4 години після контакту. З огляду на ці результати, цілком обґрунтованим є припущення про наявність у AV-10 додаткових механізмів дії, можливо, пов'язаних із порушенням іонного гомеостазу або процесів нейротрансмісії в нематод [13].

Крім антагоністичних властивостей проти класичних фітопатогенів, штам *S. avermitilis* AV-10 проявив виражену інсектицидну активність, яка була оцінена на моделях *Aphis fabae*, *Thrips tabaci* та личинок *Spodoptera littoralis*. В експериментальних умовах екстракти AV-10 викликали параліч і загибель понад 80% особин впродовж 36 годин після обробки, при цьому токсичний ефект зберігався протягом щонайменше 72 годин за умов зберігання при кімнатній температурі. Згідно з хроматографічним аналізом, основними компонентами інсектицидної дії були деривати авермектинів з модифікацією в положенні C25, що ймовірно обумовлює їхню підвищену стабільність та пролонговану дію. Додатковим чинником ефективності була наявність у складі культурального фільтрату поверхнево-активних речовин, які сприяють кращому прилипанню розчину до кутикули комах, що в свою чергу підвищує біодоступність активних сполук.

Щодо активності проти дріжджоподібних грибів, попри те, що загалом рід *Streptomyces* рідко демонструє активність проти *Candida albicans* або *Cryptococcus neoformans*, дослідження показали, що у AV-10 є певний протигрибковий ефект у відношенні *Candida glabrata*. Під час дослідів з використанням культуральної рідини AV-10 у концентрації 50% ріст колоній *C. glabrata* був пригнічений на 40%, що хоча й не є високим рівнем активності, проте вказує на потенційну наявність сполук, що можуть бути оптимізовані у ході хімічної модифікації або генно-інженерних втручань [4].

Крім того, у ході дослідницької роботи було проведено паралельне порівняльне оцінювання антагоністичного потенціалу ще двох штамів - *Streptomyces avermitilis* AV-15 та AV-20, які були ізольовані з аналогічних

грунтових біотопів, але за своїми морфологічними ознаками та біохімічним профілем продемонстрували нижчі показники щодо рівня синтезу біологічно активних сполук, зокрема авермектинів, а також вужчий спектр антагоністичної дії проти фітопатогенів, що підтверджується меншими зонами інгібування в тестах *in vitro* та нижчим відсотком загибелі нематод у біотестах.

Незважаючи на те, що обидва штами - AV-15 та AV-20 - також здатні до споруляції, формування міцелію та синтезу вторинних метаболітів, їх активність поступалася штаму AV-10 як за стабільністю ростових характеристик, так і за ефективністю дії проти досліджуваних патогенних об'єктів, що дає підстави розглядати AV-10 як найпродуктивніший серед проаналізованих ізолятів та основного кандидата для подальшої розробки на його основі біопрепаратів із фунгіцидною, нематоцидною та інсектицидною активністю.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Вплив температури на ріст культури *Streptomyces avermitilis*

Проведене дослідження дало змогу кількісно охарактеризувати залежність життєздатності культури *Streptomyces avermitilis*, вираженої у вигляді титру колонієутворюючих одиниць у рідкому середовищі, від температурного режиму культивування, який належить до числа базових регуляторних факторів, що визначають ефективність росту актиноміцетів у ферментаційних умовах. На основі отриманих емпіричних даних було побудовано температурний профіль росту (рис. 3.1), який демонструє характерну асиметричну криву з чітко визначеним оптимумом у межах 28-32 °С та піком життєздатності при 30 °С, де титр досягав найвищого значення - 7.9×10^7 КУО/мл.

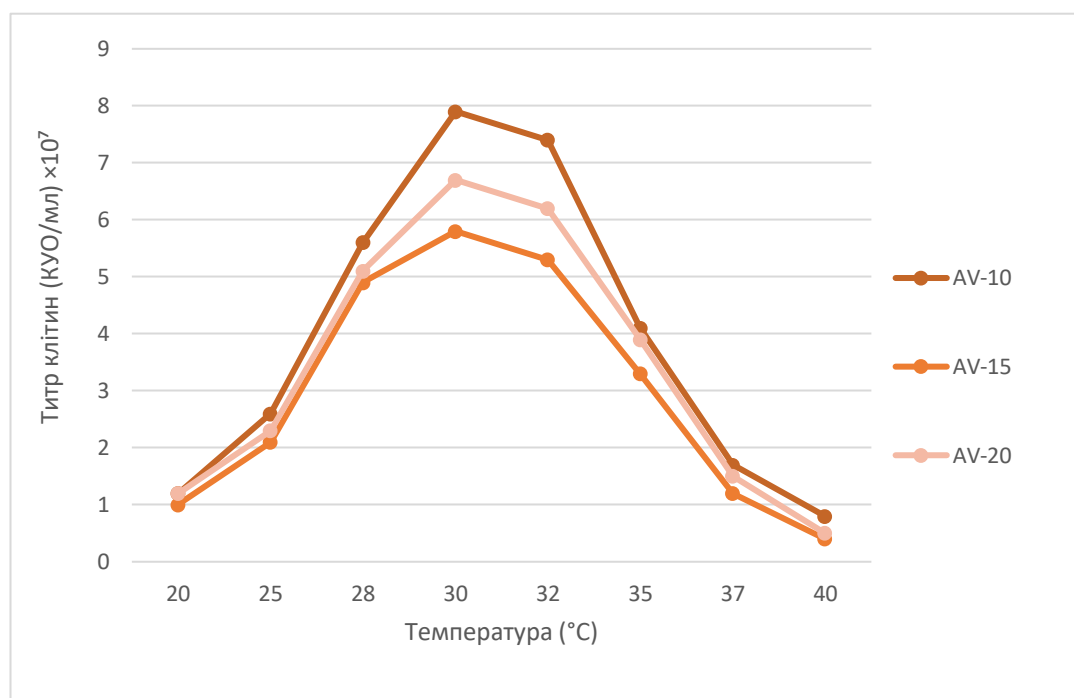


Рис 3.1 Залежність росту штамів від температури

З метою поглиблення порівняльної оцінки впливу температурного фактору на життєздатність культури, було проведено паралельні дослідження для двох додаткових штамів - *S. avermitilis* AV-15 та AV-20. Для AV-20 отримано близькі до контрольного штаму результати: максимальний титр при температурі 30 °С становив 6.7×10^7 КУО/мл, з подібним профілем росту та зоною фізіологічного оптимуму в межах 28-32 °С, що свідчить про стабільну адаптивну відповідь

цього штаму до температурного навантаження. Натомість штам AV-15 проявив значно відмінну поведінку: максимальний титр при тій же температурі сягав лише 5.8×10^7 КУО/мл, з помітно ширшою зоною субоптимальних значень та більш вираженим пригніченням росту при температурах, вищих за 32°C .

Такий рівень продуктивності культури в межах зазначеної температури свідчить про оптимальне функціонування ферментативних систем, залучених до основних енергетичних процесів, включаючи цикли гліколізу, ТКК, синтез нуклеотидів та амінокислот, а також формування міцелію та спор. Високі показники титру в цьому діапазоні є прямим свідченням активної проліферації клітинної маси в умовах, максимально наближених до фізіологічного комфорту.

У температурному інтервалі $25\text{-}28^\circ\text{C}$ спостерігалось поступове зростання титру (від 2.6×10^7 до 5.6×10^7 КУО/мл), що, найімовірніше, пояснюється стабілізацією біохімічної активності основних катаболічних ферментів і частковою активацією синтетичних шляхів, тоді як при 20°C титр істотно знижувався до 1.2×10^7 КУО/мл, що, ймовірно, обумовлено загальним уповільненням ферментативних реакцій, порушенням флюїдності мембран та зменшенням ефективності транспорту субстратів у клітину.

У протилежному температурному секторі ($35\text{-}40^\circ\text{C}$) відзначалось поступове зниження титру з 4.1×10^7 КУО/мл до мінімального значення 0.8×10^7 КУО/мл при 40°C , що може свідчити про наростаючу термодеструкцію клітинних структур, інактивацію білків, відповідальних за підтримання внутрішньоклітинного гомеостазу, та загальне пригнічення анаболічних процесів. Найімовірніше, у цьому діапазоні розпочинається індукція стресових білків теплового шоку, які не здатні повністю компенсувати втрати функціональності основних метаболічних каскадів.

3.2. Вплив показника рН на ріст культури *Streptomyces avermitilis*

У ході проведеного дослідження було встановлено, що ріст та життєздатність клітин *Streptomyces avermitilis*, культивованих у рідкому поживному середовищі, мають виразну залежність від рівня кислотно-лужного балансу, що опосередковує функціонування широкого спектра клітинних процесів - від регуляції активності ферментативних систем до стабілізації структурних компонентів цитоплазми. На основі експериментальних даних побудовано рН-профілі росту трьох штамів *S. avermitilis* - AV-10, AV-15 та AV-20, що дозволило здійснити порівняльну характеристику їх фізіолого-біохімічної відповіді на зміну кислотності середовища (рис. 3.2).

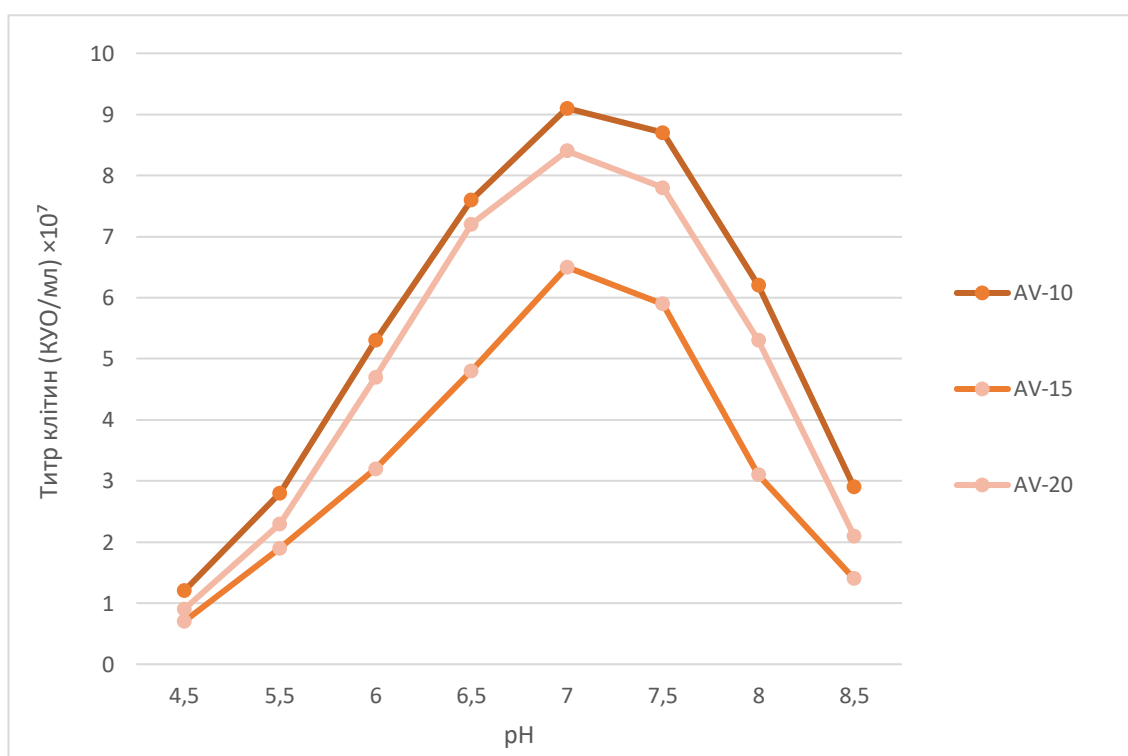


Рис 3.2 Залежність росту штамів від показника рН

Серед трьох штамів найвищу продуктивність продемонстрував AV-10, у якого при рН 7.0 титр клітин досягав 9.1×10^7 КУО/мл. Такий рівень біомаси є індикатором того, що в умовах нейтрального середовища в даного штаму реалізується максимально ефективно залучення ферментативних систем до процесів гліколізу, циклу трикарбонових кислот, синтезу амінокислот, нуклеотидів і будівельних білків. Варто підкреслити, що навіть при незначному зсуві рН у бік лужності (до 7.5) рівень титру залишався високим (8.7×10^7

КУО/мл), що свідчить про адаптаційний потенціал цього штаму до умов, де може спостерігатися коливання рН упродовж тривалого культивування.

У свою чергу, штаму AV-20, що демонстрував близькі до AV-10 результати, мав дещо нижчий максимум при рН 7.0 - 8.4×10^7 КУО/мл. Його рН-профіль був типовим для більшості актиноміцетів: плавне зростання життєздатності від помірно кислого середовища до нейтрального з наступним зниженням у лужному діапазоні. Така динаміка вказує на нормальне функціонування білкових систем рН-регуляції, проте в умовах субоптимальних значень (рН < 6.5 або > 7.5) спостерігалось помітне пригнічення росту, що підтверджує обмежену буферну стійкість цього штаму до кислотного або лужного навантаження.

Найменш продуктивним серед досліджених виявився штаму AV-15, для якого навіть в оптимальних умовах (рН 7.0) титр клітин не перевищував 6.5×10^7 КУО/мл. Значення титру швидко знижувалися при зміщенні рН середовища: до 4.8×10^7 КУО/мл при рН 6.5, 3.2×10^7 при рН 6.0, та лише 1.4×10^7 КУО/мл при рН 8.5. Така чутливість AV-15 до відхилення рН свідчить про нижчий рівень стійкості ферментних систем до змін кислотності, порушення протонного балансу та ймовірну нестабільність мембранних структур, що перешкоджає підтриманню внутрішньоклітинного гомеостазу.

Особливо важливо зазначити, що у всіх штамах за умов надмірно кислого середовища (рН 4.5-5.5) титр клітин різко знижувався: до 1.2×10^7 КУО/мл у AV-10, 0.9×10^7 у AV-20 та лише 0.7×10^7 КУО/мл у AV-15. Це вказує на наявність універсального для виду механізму пригнічення росту при підвищеній концентрації протонів, що супроводжується зменшенням ефективності енергетичних перетворень, порушенням стабільності рибосомного комплексу, інгібуванням транскрипції та перекладу.

3.3. Вплив складу живильного середовища на ріст культури *Streptomyces avermitilis*

Одним із фундаментальних чинників, що визначає інтенсивність росту, рівень метаболічної активності та продукційний потенціал мікроорганізмів при рідинному культивуванні, є якісний склад живильного середовища, зокрема співвідношення макро- та мікроелементів, а також доступність джерел вуглецю, азоту й регуляторних компонентів.



Рис 3.3.1 Штам AV-10 на модифікованому середовищі

З огляду на це, в межах проведеного дослідження було здійснено комплексне порівняння ростових характеристик трьох лабораторно-культивованих штамів *Streptomyces avermitilis* - AV-10, AV-15 і AV-20 - на трьох різних рідких живильних середовищах: класичному середовищі Гаузе, середовищі Баннетта та модифікованому середовищі з мікроелементним збагаченням, спеціально розробленому у співпраці з МНТЦ «Агробіотех» НАН

та МОН України для потреб оптимізації біосинтезу авермектинів. Кількісні результати проілюстровано на рисунку 3.3.2.

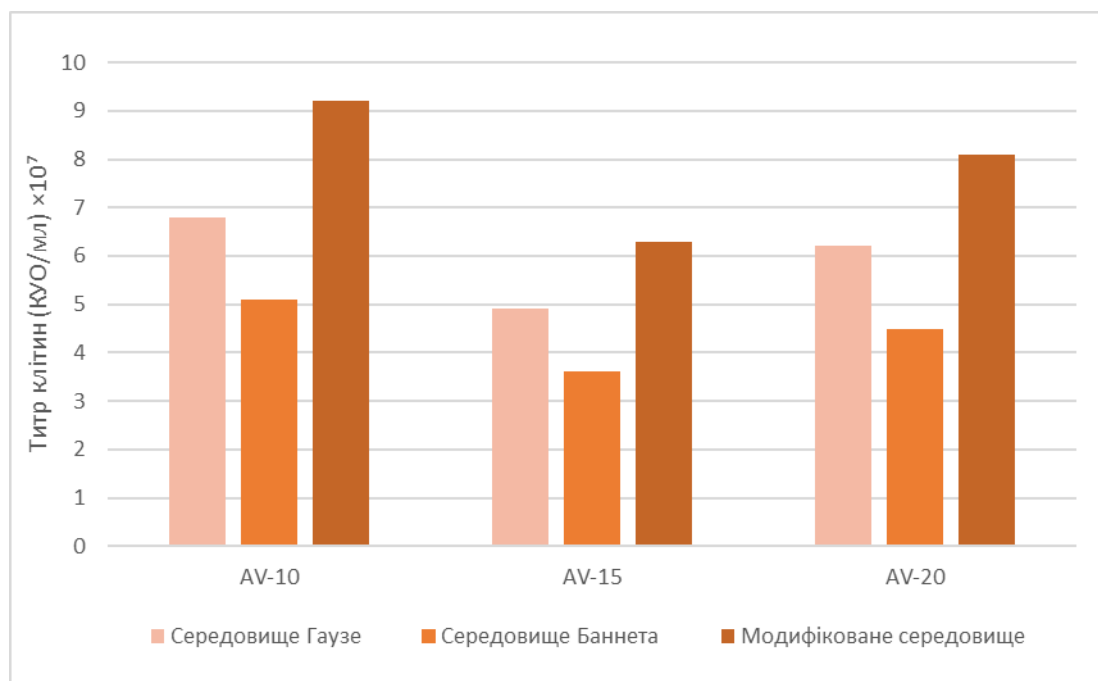


Рис 3.3.2 Вплив різних живильних середовищ на ріст культури *S. avermitilis*

Найвищі показники титру клітин були зафіксовані на модифікованому середовищі, що логічно відповідає його збагаченому складу. Зокрема, для штаму AV-10 титр сягнув 9.2×10^7 КУО/мл, що є найвищим результатом серед усіх комбінацій штам–середовище в даному дослідженні. Подібна продуктивність, без сумніву, зумовлена наявністю D-глюкози як оптимального джерела вуглецю, аспарагінової кислоти як не лише джерела азоту, а й попередника ключових метаболітів, а також мікроелементів - зокрема іонів Fe^{3+} , Mn^{2+} та Cu^{2+} , які беруть участь у складі ензимів, що каталізують окисно-відновні, енергетичні й біосинтетичні процеси. Особливо важливою є роль тривалентного заліза у складі цитохромів, що забезпечують електронний транспорт у дихальному ланцюзі, а також марганцю, який активує супероксиддисмутазу - фермент, критично важливий для захисту клітин від окисного стресу, характерного для пізніх стадій інтенсивного росту.

Штам AV-20 на цьому ж середовищі продемонстрував порівняно високий, хоча й нижчий за AV-10, рівень титру - 8.1×10^7 КУО/мл, що свідчить про добру

метаболичну сумісність цього штаму з компонентами середовища та відносну стабільність його ферментативних систем. Такий результат дозволяє розглядати AV-20 як потенційно перспективний для масштабованого культивування, хоча в контексті оптимального вибору продуктивного штаму перевага все ж залишається за AV-10.

Зовсім інша ситуація спостерігалась у випадку AV-15, для якого титр клітин на модифікованому середовищі становив лише 6.3×10^7 КУО/мл. Цей показник, хоча і перевищує результати на інших середовищах, свідчить про менш виражену адаптивну реакцію штаму до стимулюючих компонентів середовища, що може бути наслідком обмеженої ефективності регуляторних систем або меншої здатності до засвоєння окремих поживних речовин.

На фоні цього, живильне середовище Гаузе забезпечило помірний, але стабільний рівень росту для всіх трьох штамів, із максимальним титром у AV-10 - 6.8×10^7 КУО/мл, що майже на третину нижче від показника на модифікованому середовищі. У випадку AV-15 цей показник становив лише 4.9×10^7 КУО/мл, що є нижчим за середній рівень і вказує на відносно низьку ефективність засвоєння поживних речовин при відсутності мікроелементного доповнення. Однак сам факт того, що середовище Гаузе підтримувало життєздатність та проліферацію клітин, дозволяє трактувати його як функціональну базу для етапів адаптації або збереження культури.

Найгірші результати з усіх досліджених варіантів були зафіксовані на середовищі Баннетта. Титр клітин штаму AV-15 сягнув лише 3.6×10^7 КУО/мл, що свідчить про гальмування росту, ймовірно, внаслідок негативної дії високого стартового рН (близько 8.0), що порушує активність рН-чутливих ферментів та може спричинити алкалізацію цитоплазми. Крім того, перевантаження легко метаболізованими вуглецевими джерелами потенційно активувало механізм катаболічної репресії, що обмежує експресію ферментів вторинного метаболізму й призводить до нагромадження проміжних метаболітів, здатних проявляти токсичний ефект, особливо в умовах тривалого культивування.

Підсумовуючи результати цього етапу дослідження, можна сказати, що модифіковане збагачене середовище є найефективнішим серед протестованих варіантів для стимуляції росту *Streptomyces avermitilis*, зокрема штаму AV-10, що демонструє найвищий титр клітин серед усіх досліджених. Міжштамова варіабельність реакції на живильне середовище підкреслює важливість індивідуального підходу до оптимізації умов культивування з урахуванням генетичних та метаболічних особливостей кожного штаму.

ВИСНОВКИ

На підставі проведених експериментальних досліджень, що стосувалися порівняльного аналізу трьох штамів *Streptomyces avermitilis* в умовах змін температури, рН середовища та складу живильного субстрату, було сформульовано такі висновки:

1. При вивченні температурних факторів виявлено значний зв'язок між температурою культури та інтенсивністю росту всіх досліджуваних штамів. Найвищі темпи розвитку повітряного та матричного міцелію спостерігалися в діапазоні температур 28-30°C, однак варто відзначити, що один із штамів (*S. avermitilis* AV-10) показав виражену чутливість до підвищення температури понад 32°C, про що свідчить зниження щільності міцелію та пригнічення спороношення, тоді як інші штами залишалися помірно активними. при температурі до 35°C.
2. У більшості досліджуваних штамів виявлено оптимальні умови росту при нейтральному значенні рН 7,0, що забезпечує не лише максимальну швидкість проліферації, а й збереження стабільної колоніальної морфології. Разом з тим, один із штамів виявив підвищену стійкість до умов слабколужного середовища (рН у межах 7,5-8,0), що, ймовірно, вказує на специфічні особливості буферного потенціалу клітинної оболонки та більш адаптовану ферментативну систему, здатну підтримувати метаболічну активність за зміни кислотно-лужного режиму.
3. За результатами вирощування на різних типах поживних середовищ (середовище Гаузе, агар Баннетта та модифіковане збагачене середовище), було встановлено, що максимальна біомаса, найактивніше формування спор та найбільш насичене пігментування колоній спостерігалися саме на модифікованому середовищі з додаванням мікроелементів, амінокислот та джерел легкозасвоюваного карбону. При цьому штами демонстрували різну динаміку росту залежно від складу середовища, що вказує на індивідуальні потреби кожного продуцента у доступних макро- та мікроелементах.

Таким чином, за результатами проведеної роботи можна стверджувати, що для забезпечення високої активності штаму *Streptomyces*, який входить до складу біостимулятора Регоплант, рекомендовано використовувати температурний режим 28-30°C, підтримувати нейтральне або слаболужне значення рН залежно від специфіки штаму, використовувати збагачене мікро- та макроелементами поживне середовище, адаптоване до метаболічних потреб конкретного штаму. Такий підхід не тільки покращує вихід біомаси та вторинних метаболітів, але й забезпечує стабільність процесу культивування на промисловому рівні.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Регулятори росту в рослинництві. Рекомендації по застосуванню. – К.: МНТЦ —Агробіотех НАН та МОН України
2. Сищикова О. Біологічні властивості та таксономічний склад стрептоміцетів природних ґрунтів та техноземів Криворіжжя. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2014. С. 91–104.
3. Antagonistic activity of soil *streptomyces* against phytopathogenic bacteria and fungi / О. А. Дрегваль та ін. *Microbiology&Biotechnology*. 2017. № 1(37). С. 73–84.
4. Antagonistic properties of the black sea streptomyces isolated from the fouling of shell rock and mussels/ I.V.Strashnova та ін. *Microbiology&Biotechnology*. 2023. № 3(56). С. 6–23.
5. Bashan Y., de-Bashan L. E. How the plant growth-promoting bacterium azospirillum promotes plant growth—a critical assessment. *Advances in agronomy*. 2010. С. 77–136.
6. Biological control based on microbial consortia – from theory to commercial products / R. Czajkowski та ін. *Progress in biological control*. Cham, 2020. С. 183–202.
7. Biotechnological application of Streptomyces for the production of clinical drugs and other bioactive molecules / F. Del Carratore та ін. *Current opinion in biotechnology*. 2022. Т. 77. С. 102762.
8. Biotechnological production of carotenoids using low cost-substrates is influenced by cultivation parameters: a review / W.S. Igreja та ін. *International journal of molecular sciences*. 2021. Т.22, №16. С. 8819.

9. Biotechnology: role of microbes in sustainable agriculture and environmental health. *The internet journal of microbiology*. 2012. Т.10, № 1. URL: https://www.researchgate.net/publication/257525957_Biotechnology_Role_Of_Microbes_In_Sustainable_Agriculture_And_Environmental_Health (дата звернення: 03.04.2025).
10. Development of an algorithm for optimization of continuous technological process of cultivation of microorganisms/ S.Rakhmanov та ін. *E3S web of conferences*. 2021. Т.264. С.04032.
11. Frankovitch C.M. Optical methods for monitoring biological parameters of phototropic microorganisms during cultivation : phd thesis. 2007.
12. Hasani A., Kariminik A., Issazadeh K. Streptomycetes: characteristics and their antimicrobial activities. *International journal of advanced biological and biomedical research*. 2014. Т.2, №1. С.63–75.
13. Identification and antagonistic properties of the soil streptomycete streptomycetes sp. 100/ L.A. Biliavska та ін. *Mikrobiolohichnyi zhurnal*. 2016. Т.78, №2. С.61–73.
14. Jain S., Jain J., Singh J. The rhizosphere microbiome: microbial communities and plant health. *Plant microbiome paradigm*. Cham, 2020. С.175–190.
15. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology / H. Gao та ін. *Bioresource technology*. 2009. Т.100, №17. С.4012–4016.
16. Medium preparation for the cultivation of microorganisms under strictly anaerobic/anoxic conditions / A. O. Wagner та ін. *Journal of visualized experiments*. 2019. № 150. URL:

17. Microbial inoculants in sustainable agriculture: advancements, challenges, and future directions/ A. M. Díaz-Rodríguez та ін. *Plants*. 2025. Т. 14, № 2. С. 191.

18. Niazi S. K. EU guidelines to good manufacturing practice medicinal products for human and veterinary use. *Handbook of pharmaceutical manufacturing formulations*. 2019. С. 93–108.

19. Ranjitha Kumari P. M. A critical review on plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of plant pathology & microbiology*. 2015. Т. 06, № 04.

20. Reineke W., Schlömann M. Microbial degradation of pollutants. *Environmental microbiology*. Berlin, Heidelberg, 2023. С. 161–290.

21. Role of biotechnology in creating sustainable agriculture / S. Das та ін. *PLOS sustainability and transformation*. 2023. Т. 2, № 7. С. e0000069. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pstr.0000069> (дата звернення: 03.04.2025).

22. SigN is responsible for differentiation and stress responses based on comparative proteomic analyses of *Streptomyces coelicolor* wild-type and sigN deletion strains / C. Wang та ін. *Microbiological research*. 2010. Т. 165, № 3. С. 221–231.

23. Smith L. Laboratory biosafety manual. *Pathology*. 1984. Т. 16, № 4. С. 487.

24. Soil microbiome: applications and mechanisms for salinity stress mitigation in plant and soil ecology: a review / A. S. Gaikwad та ін. *International journal of advanced biochemistry research*. 2024. Т. 8, № 3. С. 923–946.

25. Spectrophotometric analysis of bioactive metabolites and fermentation optimisation of *Streptomyces* sp. HU2014 with antifungal potential against *Rhizoctonia solani* / H. Zhu та ін. *Biotechnology & biotechnological equipment*. 2023. Т. 37, № 1. С. 231–242.

26. *Streptomyces avermitilis*: component composition, properties / O. S. Brovko та ін. *Chemistry of plant raw material*. 2020. № 1. С. 57–66.

27. *Streptomyces avermitilis* MICNEMA2022: a new biorational strain for producing abamectin as an integrated nematode management agent / W. H. Radwan та ін. *BMC microbiology*. 2024. Т. 24, № 1.

28. Umesha S., K. Singh P., P. Singh R. Microbial biotechnology and sustainable agriculture. *Biotechnology for sustainable agriculture*. 2018. С. 185–205.

29. Vassileva M. Sustainable crop production: p-solubilizing biofertilizers. *18th international multidisciplinary scientific geoconference SGEM2018*. 2018.