

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету захисту рослин,
біотехнологій та екології

Юлія КОЛОМІЄЦЬ

(підпис)

« ____ » _____ 2026 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри екобіотехнологій та
біорізноманіття

Олена КВАСКО

(підпис)

« ____ » _____ 2026 р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему «Біоре mediaція забруднених екосистем за допомогою ендоефітних бактерій
роду *Bacillus* »**

Спеціальність «162 Біотехнологія та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма « Біотехнології та біоінженерія »

Гарант освітньої програми

Кандидат біологічних наук, доцент

Олена КВАСКО

(підпис)

Керівники кваліфікаційної роботи

Кандидат біологічних наук, доцент

Олена КВАСКО

(підпис)

Олександр МАНЖУРА

(підпис)

Виконала

Софія ПИЛИПАКА

(підпис)

КИЇВ-2026

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

екобіотехнології та біорізноманіття

Кандидат біологічних наук, доцент _____ Олена КВАСКО
“_____” _____ 2026 р.

**З А В Д А Н Н Я
ДО ВИКОНАННЯ БАКАЛАВРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ ЗДОБУВАЧУ**

Пилипаці Софії Олександрівні

(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність «162 Біотехнологія та біоінженерія» _____»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології та біоінженерія» _____»

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи

«Біоремедіація забруднених екосистем за допомогою ендоефітних бактерій роду *Bacillus*» _____»

затверджена наказом від «30» жовтня 2025 року № 2596 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру «22» травня 2026 р.

Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи:

насіння *Astragalus dasyanthus*.; живильне середовище Гамбурга (B5).

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Отримати чисті лінії рослин *Astragalus dasyanthus*;
2. Виділення та очищення ендоефітних бактерій;
3. Дослідження біоремедіаційних властивостей виділених бактерій за допомогою модельних забруднювачів.

Дата видачі завдання «30» жовтня 2025 р.

**Керівник бакалаврської
кваліфікаційної роботи**

(підпис)

Олена КВАСКО

Завдання взяла до виконання

(підпис)

Софія ПИЛИПАКА

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота виконана на тему «Біоремедіація забруднених екосистем за допомогою ендоефітних бактерій роду *Bacillus*» в обсязі 40 сторінок комп'ютерного тексту формату А4, містить 3 таблиці, 2 додатка 48 використаних джерела.

Ключові слова: БІОРЕМЕДІАЦІЯ, ЕНДОФІТНІ БАКТЕРІЇ, *BACILLUS* SPP., *ASTRAGALUS DASYANTHUS*, ПЕРМАНГНАТ КАЛІЮ, БІОСОРБЦІЯ.

Метою даної роботи є оцінка потенціалу використання ендоефітних бактерій роду *Bacillus* для очищення екосистем від забруднювачів, для досягнення якої поставлено такі завдання:

1).Ввести в культуру *in vitro* рослини *Astragalus dasyanthus*, виділити та очистити ендоефітні бактерії роду *Bacillus*; 2).Дослідити здатність отриманих бактерій до біотрансформації модельних забруднювачів. 3).Кількісно визначити здатність біологічного об'єктів до біодеградації модельного забруднювача.

Об'єктом дослідження є процес біоремедіації антропогенно змінених екосистем за участю ендоефітних бактерій.

Предметом дослідження біологічні властивості ендоефітних бактерій роду *Bacillus*, що викликають деградацію забруднювачів у навколишньому середовищі.

В роботі застосовано такі методи дослідження як біотехнологічні, мікробіологічні, фізико-хімічні а також статистичні.

Результатами дослідження є успішна ізоляція ендоефітних штамів бактерій роду *Bacillus* зі стерильних культур *in vitro* *Astragalus dasyanthus*, які виявили високу стійкість та метаболічну активність в умовах токсичного навантаження перманганатом калію. Кількісний аналіз підтвердив здатність виділених штамів здійснювати ефективну біотрансформацію та редукцію шкідливого окисника до безпечніших іонів мангану шляхом клітинної біосорбції, що відкриває високий потенціал для їх застосування в екологічній біотехнології, зокрема для створення біопрепаратів та рекультивації забруднених ґрунтів.

ABSTRACT

The qualification work was carried out on the topic "Bioremediation of polluted ecosystems using endophytic bacteria of the genus *Bacillus*" in the amount of 40 pages of computer text in A4 format, contains 3 tables, 2 appendices, 48 sources used.

Keywords: BIOREMEDIATION, ENDOPHYTIC BACTERIA, BACILLUS SPP., ASTRAGALUS DASYANTHUS, POTASSIUM PERMANGANATE, BIOSORPTION.

The aim of this work is to assess the potential of using endophytic bacteria of the genus *Bacillus* for cleaning ecosystems from pollutants, to achieve which the following tasks were set: 1). To introduce *Astragalus dasyanthus* plants into in vitro culture, to isolate and purify endophytic bacteria of the genus *Bacillus*; 2). To investigate the ability of the obtained bacteria to biotransform model pollutants; 3). Quantitatively determine the ability of biological objects to biodegrade a model pollutant.

The object of the study is the process of bioremediation of anthropogenically altered ecosystems with the participation of endophytic bacteria.

The subject of the study is the biological properties of endophytic bacteria of the genus *Bacillus*, which cause the degradation of pollutants in the environment.

The work uses such research methods as biotechnological, microbiological, physicochemical and statistical.

The results of the study are the successful isolation of endophytic strains of bacteria of the genus *Bacillus* from sterile in vitro cultures of *Astragalus dasyanthus*, which showed high resistance and metabolic activity under conditions of toxic loading with potassium permanganate. Quantitative analysis confirmed the ability of the isolated strains to carry out effective biotransformation and reduction of a harmful oxidant to safer manganese ions through cellular biosorption, which opens up high potential for their application in environmental biotechnology, in particular for the creation of biological products and the remediation of contaminated soils.

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Екологічні наслідки сучасного техногенного забруднення екосистем	6
1.1.1. Джерела та масштаби антропогенного впливу	6
1.1.2. Типи забруднювачів екосистем	7
1.1.3. Вплив токсикантів на елементи екосистеми	9
1.2. Основи біоремедіації забруднених екосистем	10
1.2.1. Біодеградація та біотрансформація токсикантів	10
1.2.2. Біоаккумуляція та біосорбція	11
1.2.3. Роль ферментативних систем мікроорганізмів у біоремедіації	13
1.3. Ендофітні бактерії та їх екологічне значення	14
1.3.1. Поняття ендофітів та їх різноманіття	14
1.3.2. Механізми колонізації рослин	16
1.3.3. Ендофітні бактерії астрагалу	18
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	20
2.1. Методи виділення ендофітних бактерій	20
2.1.1. Виділення ендофітів на рослинному матеріалі	20
2.1.2. Виділення ендофітів за допомогою насіння	24
2.2. Ідентифікація ендофітних бактерій	25
2.2.1. Візуальна оцінка колоній	25
2.2.2. Фарбування за грамом	26
2.2.3. Виділення чистої культури <i>Bacillus spp.</i>	27
2.3. Тест на здатність до редукції $KMnO_4$	28
2.3.1. Приготування модифікованого середовища	28

2.3.2. Посів чистої культури та інкубація	29
2.4. Кількісне визначення іонів мангану спектрофотометричним методом ...	30
2.4.1. Фотометричне визначення концентрації іонів мангану(II).....	30
2.4.2. Побудова калібрувального графіка	31
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	33
3.1. Оцінка біоремедіаційних властивостей ендofітних бактерій рослин <i>Astragalus dasyanthus</i>	33
3.2. Оцінка життєздатності бактерій методом підрахунку колонієутворюючих одиниць	34
3.3. Дослідження здатності бактерії <i>Bacillus</i> до редукції перманганату калію	35
3.4. Кількісна зміна концентрації іонів Mn^{2+} після культивування бактерій ..	36
3.5. Порівняння отриманих результатів з даними літератури та значення для біоремедіації	38
ВИСНОВКИ	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	41

ВСТУП

В умовах зростаючого антропогенного навантаження на довкілля особливої актуальності набуває пошук екологічно безпечних та ефективних підходів до очищення забруднених екосистем. Одним із перспективних напрямів є використання біоремедіаційних технологій, що ґрунтуються на здатності живих організмів деградувати токсичні сполуки. У цьому контексті важливу роль відіграють мікроорганізми, зокрема бактерії, які характеризуються високою метаболічною активністю та адаптивністю до несприятливих умов середовища.

Серед великої різноманітності бактерій особливу увагу привертають ендofітні форми — мікроорганізми, що колонізують внутрішні тканини рослин без спричинення їх патологічних змін. Завдяки тісній взаємодії з рослиною-господарем вони здатні проявляти унікальні фізіолого-біохімічні властивості, зокрема детоксикацію шкідливих речовин. Перспективним джерелом таких мікроорганізмів є рослини, адаптовані до екстремальних умов, зокрема до ґрунтів, забруднених важкими металами. До таких рослин належить *Astragalus dasyanthus*, який здатний зростати в умовах підвищеного вмісту токсичних елементів, що обумовлює формування специфічної ендofітної мікрофлори з потенційно високою біодеструктивною активністю.

Крім того, здатність *Astragalus dasyanthus* існувати у середовищах із підвищеним вмістом окисно-активних сполук зумовлює вибір модельного забруднювача — перманганату калію, який широко застосовується як сильний окисник і є репрезентативним для оцінки біотрансформаційного потенціалу мікроорганізмів. Незважаючи на відомі фармакологічні властивості цієї рослини, її потенціал як джерела ендofітних бактерій залишається недостатньо дослідженим.

Враховуючи вищезазначене, метою даної роботи є виділення ендofітних бактерій із рослин *Astragalus dasyanthus*, зокрема представників роду *Bacillus spp.*, та експериментальна оцінка їхнього біоремедіаційного потенціалу щодо трансформації модельних забруднювачів.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Екологічні наслідки сучасного техногенного забруднення екосистем

1.1.1. Джерела та масштаби антропогенного впливу

Антропогенний вплив на навколишнє середовище є невід'ємним супутником розвитку людської цивілізації. У діяльності людини чинники до деструктивної дії відразу на всі екологічно пов'язані складові біосфери. Ці складові являють собою суходільні та ландшафти та водні екосистеми, тісно пов'язані з життєдіяльністю людини. Масштаби деструктивних змін досягли рівня, що створює велику загрозу для стабільного функціонування біосфери як глобальної системи [1].

Одним із найбільших тривалості за час та значних за площею є аграрний вплив, наслідки якого є незворотними. В Україні, що є типовою аграрною країною, землі, які піддаються сільськогосподарській діяльності, становлять понад 70% площі країни. Інтенсивне землеробство привело до значної кількості хімікатів у ґрунтовому покриві, а саме залишки нітратних добрив та стійких пестицидів. Вони разом із важкими металами накопичуються в родючому шарі, змінюючи його мікробіоту та руйнуючи біологічне рівновагу. У процесі вимивання опадами токсичні речовини мігрують у підземні та поверхневі води, набуваючи мобільних форм. Розчинені хімікати згодом через кореневу систему можуть потрапляти у рослини та створювати глобальний цикл колообігу. Через механізми біоаккумуляції концентрація забруднювачів зростає на кожному наступному трофічному рівні.

Промислове забруднення є актуальним потужним чинником антропогенного впливу на довкілля, зумовлене функціонування різноманітних підприємств. Транспортний сектор забезпечує стабільну кількість важких металів через викиди в атмосферу, які пізніше осідають на поверхні земної кори, та завдають шкоди живим групам організмів. Критичний внесок у деградацію середовища робить енергетичний галузь, зокрема теплові електростанції, які насичують повітря діоксидом сірки та оксидами азоту, що призводить до

випадіння кислотних дощів. Хімічна та нафтопереробна промисловість виступають джерелами специфічних токсикантів, які мають здатність накопичуватися в біологічних тканинах і виявляють мутагенні ефекти.

Окремої уваги потребує мілітарний вплив, який в умовах повномасштабної війни набув катастрофічних обсягів. Бойові дії спричиняють пряме механічне руйнування підстав вибухами та рухом важкої техніки. Хімічне забруднення продуктами детонації боєприпасів, особливо сполуками сірки, міді та інших токсичних елементів, спричиняє забруднення величезної площі [2]. Масові лісові пожежі, спричинені обстрілами, та підриви гідротехнічних споруд, зокрема катастрофи на Каховській ГЕС [3], призводять до екологічних наслідків. Замінювання території вилучає їх із природного обігу на десятиліття, створюючи тривалу загрозу для біоти та людини.

1.1.2. Типи забруднювачів екосистем

Сучасний етап техногенного розвитку суспільства характеризується масштабним антропогенним впливом на довкілля та зростання хімічного навантаження на всі компоненти біосфери. Інтенсивна хімізація виробництва, транспорту і сільського господарства до суттєвої трансформації фізико-хімічних параметрів природних екосистем. Завдяки цій зміні механізму функціонування біогеоценозів, порушуються трофічні зв'язки та знижується рівень біорізноманіття. Особливу небезпеку становлять стійкі антропогенні контамінанти, здатні до тривалого збереження в довкіллі.

Серед них провідне місце займають важкі метали, пестициди та нафтопродукти. Ці сполуки характеризуються високою токсичністю та здатністю до біоаккумуляції. Накопичуючи у тканинах організмів, вони перебувають трофічними ланцюгами. У результаті концентрація токсикантів на верхньому рівні харчових мереж може в десятки разів перевищити їх вміст у середовищі.

До пріоритетних небезпечних забруднювачів належать свинець, кадмій і ртуть. Ці елементи відзначаються високою хімічною стабільністю та здатністю

до тривалої циркуляції в геохімічних циклах [4]. Основними джерелами їх надходження є промислові підприємства, транспортний сектор, теплоенергетика.

У обґрунтованому середовищі важкі метали утворюють малорозчинні комплекси з органічною речовиною та мінеральними частинками. такі сполуки практично не піддаються біологічному розкладу. Водночас зміна кислотності або окисно-відновного потенціалу може підвищити їх мобільність.

У водних екосистемах метали акумулюються в донних відкладах, формуючи тривалі осередки вторинного забруднення. За певних умов вони можуть повторно переходити у розчинену форму то нести негативні наслідки для водної біоти.

Пестициди становлять окрему групу синтетичних ксенобіотиків антропогенного походження. Вони цілеспрямовано застосовуються в агроекосистемах для контролю чисельності небажаних шкідників та бур'янів.

Однак їх використання супроводжується значним токсикологічними впливами на екологічні складові. Більшість сучасних препаратів здатні зберігати активність у ґрунті протягом тривалого часу. Частина сполук мігрує у ґрунтово-водному середовищі та проникає в підземні води [5].

Нафтопродукти є одним із наймасовіших видів техногенного забруднення. Вони потрапляють у довкілля внаслідок аварій під час транспортування, витоків із трубопроводів та діяльності нафтопереробних підприємств. У водному середовищі нафта утворює поверхневу плівку, що перешкоджає газообміну. Очищення нафтового забруднення територій є складним та економічно затратним процесом.

Військові дії останніх років істотно посилили техногенне навантаження на довкілля. Руїнування промислових об'єктів і складів паливно-мастильних матеріалів супроводжується масштабними викидами токсикантів [6]. Унаслідок цього формується комплексний токсичний ефект на екосистему в цілому.

Сукупна дія перелічених хімічних забруднювачів зумовлює довготривалі екологічні наслідки.

1.1.3. Вплив токсикантів на елементи екосистеми

Антропогенна трансформація довкілля супроводжується зростанням хімічного навантаження на всі компоненти біосфери, що проявляється на різних рівнях організації живої матерії.

Ґрунт виступає ключовим посередником перерозподілу та метаболізму ксенобіотиків. Важкі метали, агрохімікати та вуглеводні нафти сорбуються поверхневим шаром ґрунту, змінюючи показники pH , катіонообмінну здатність та резистентність середовища до зовнішніх впливів. Акумуляція важких металів, таких як: плумбуму, кадмію та меркурію призводить до появи техногенного пригнічення біологічного потенціалу субстрату.

При потраплянні нафтових фракцій у ґрунтовий простір відбувається порушення газообміну та гідрологічний режим, що згубно впливає на мікрорганізми флори та фауни. Уповільнюються фундаментальні процеси гуміфікації, нітрифікації та розкладання органіки. Систематичне внесення мінеральних добрив і гербіцидів спричиняє структурну деградацію земель, втрату гумусового шару та збіднення біотичного різноманіття [7].

Фітоценози є первинними акцепторами ґрунтових та водних забруднювачів. Важкі метали концентруються в кореневій системі та вегетативних органах, блокуючи роботу ензимів, гальмуючи фотосинтетичні процеси та дихання. Спостерігається деградація хлорофілу, порушення селективної проникності біомембран та запуск оксидативних реакцій [8]. Для хлорорганічних агентів характерна висока здатність до накопичення в зеленій біомасі рослинних організмів. У рослинних організмах вони спричиняють мутагенез. На рівні біоценозу це трансформується у зміну видового складу, зменшення різноманіття.

У гідроекосистемах нафтова плівка ізолює поверхню води від атмосферного кисню, провокуючи гіпоксію гідробіонтів. Легкі фракції вуглеводнів чинять пряму токсичну дію та пригнічують на прибережну рослинність та мікроводорості.

Мікробіота є найчутливішим біоіндикатором антропогенного навантаження. Навіть незначні дози пестицидів пригнічують життєдіяльність азотфіксуючих та деструктивних мікроорганізмів. Це провокує збої в глобальних циклах азоту, карбону та фосфору [9]. Тривалий контакт із токсикантами веде до розвитку резистентних штамів мікроорганізмів, що суттєво структурує мікробного ценозу. Зменшення мікробіоти ґрунту прямо корелює з деградацією родючості [9].

1.2. Основи біоремедіації забруднених екосистем

1.2.1. Біодеградація та біотрансформація токсикантів

Біологічний розклад поллютантів виступає фундаментальним інструментом природної самоочистки довкілля, що реалізується завдяки метаболічному потенціалу мікробних організмів різних екологічних груп. Процес біодеградації являє собою комплекс ферментативних процесів, спрямованих на перетворення ксенобіотиків у сполуки з нижчим рівнем токсичності або їх повну мінералізацію. Ключовими агентами деструкції є бактеріальні культури, мікроскопічні гриби та актиноміцети, мікроводорості здатні асимілювати токсиканти як енергетичний ресурс та субстрат для нарощування біомаси [10].

Значна роль у деградації різного роду забруднювачів належить представникам роду *Bacillus*, що вирізняються високою пластичністю та стійкістю до екстремальних умов [11]. Зокрема, застосування термофільних штамів *Bacillus thermoamylovorans* дозволяє знизити вміст органічної речовини на 67 % протягом десятидобового циклу за температурного режиму близько 60°C [12]. Такі дані підтверджують ефективність методів біоконверсії з використанням підвищених температурних режимів у сфері переробки субстратів із високим рівнем органічного навантаження.

Процеси біотрансформації охоплюють реакції гідролізу, окиснення, відновлення, що докорінно змінюють хімічну структуру ксенобіотиків. У ґрунтовому середовищі ці перетворення каталізуються різноманітними

ферментами, як наприклад: оксидазами, дегідрогеназами та пероксидазами мікробного походження. Оптимальна інтенсивність розкладу досягається за умови вологості 50–60 % та дотримання балансу вуглецю до азоту (C:N) у межах 25–30:1 [13]. Стабілізація температури в інтервалі 50–65 °C активізує термофільну мікрофлору, що значно прискорює деструкцію органіки [13].

Поводження з важкими металами під час біотрансформації має особливості, оскільки ці елементи не піддаються біологічному розкладу. Мікроорганізми впливають на них шляхом зміни валентності або переведення у маломобільні стани [14]. Окисно-відновні реакції змінюють ступінь біодоступності металів, що безпосередньо корелює з рівнем їхньої небезпеки для живих організмів [14].

Перспективним напрямом є анаеробне знешкодження органічних отрут у багатофазних системах, що дає змогу збільшити вихід метану на 10–30 % [13]. Подібні підходи дозволяють поєднувати детоксикацію середовища з генерацією біогазу як альтернативного джерела енергії [13].

У ході біоконверсії формується екологічно стабільний продукт із мінімальною фітотоксичністю. Результати апробацій вказують на зростання мікробної біомаси вуглецю на 126 % та азоту на 49 % після застосування біоконвертованих матеріалів у ґрунт [15].

Важливо, що мікробіологічна деградація часто супроводжується продукуванням біосурфактантів. Ці сполуки покращують розчинність гідрофобних агентів, полегшуючи доступність ферментів до токсикантів. Критичною умовою успішної трансформації інтенсивна аерація, яка запобігає накопиченню токсичних проміжних метаболітів [13].

1.2.2. Біоаккумуляція та біосорбція

Біоаккумуляція являє собою процес концентрування токсичних речовин живими організмами з довкілля, що виникає через перевищення швидкості їх надходження над швидкістю виведення. Цей процес відіграє вирішальну роль у

міграції органічних ксенобіотиків та важких металів по трофічних ланцюгах водних і ґрунтових екосистем. Рівень депонування поллютантів у клітинах мікроорганізмів обумовлений фізико-хімічними параметрами середовища та властивостями самих сполук до мобільності у організмі.

Залежно від способів транспортування речовин крізь клітинні мембрани, біоаккумуляція може відбуватися за пасивним або активним типом [16]. Пасивне накопичення реалізується через адсорбцію на поверхні або дифузію, тоді як активна біоаккумуляція базується на функціонуванні енергозалежних транспортних систем клітини [16].

Важкі метали здатні до іонообміну або утворення зв'язків із карбоксильними, амініними та фосфатними групами клітинної стінки. Такі взаємодії з біополімерами сприяють іммобілізації металів [16]. Внутрішньоклітинна детоксикація часто досягається через комплексоутворення або синтез специфічних металзв'язувальних білків [17]. Окремі мікроорганізми здатні до біотрансформації металів у менш небезпечні форми, що є важливою складовою механізмів виживання та стабілізації металів у ґрунтах.

Біосорбція використовується як високоефективний та екологічно безпечний фізико-хімічний процес вилучення іонів металів із середовища за допомогою біомаси біоагентів. На відміну від біоаккумуляції, біосорбція переважно локалізує токсичний агент на поверхні клітини, що означає її незалежність від її метаболічної активності, що дозволяє використовувати навіть інактивовані клітини як сорбент.

Ефективність сорбційних процесів визначається pH , температурним режимом та концентрацією поллютантів у розчині [18]. Застосування таких методів демонструє високу селективність та дозволяє суттєво знизити рівень вмісту свинцю і кадмію у стічних водах. Для оптимізації процесу біосорбенти можуть бути іммобілізовані на спеціальних носіях, що забезпечує стабільність композитних матеріалів [19].

Біоаккумуляція та біосорбція є значущими компонентами сучасних екобіотехнологічних стратегій ремедіації.

1.2.3. Роль ферментативних систем мікроорганізмів у біоремедіації

У сучасній екологічній біотехнології ферментативні методи посідають провідне місце, забезпечуючи високоефективну деструкцію органічних та неорганічних забруднювачів [20]. Інтенсифікація процесів біоремедіації досягається завдяки винятковій каталітичній активності та субстратній специфічності біокаталізаторів .

Ключову роль у трансформації токсичних сполук відіграють оксидоредуктази, механізм дії яких базується на реакціях окиснення-відновлення, що сприяють детоксикації ксенобіотиків [20]. Окрім них, вагоме значення мають ліпази, пероксидази, оксидази та фосфатази, здатні до розщеплення широкого спектра складних органічних структур таких, як: пестицидів, нафтопродуктів. Головною перевагою таких методів є висока селективність, що мінімізує утворення побічних продуктів під час очищення.

Сучасні технологічні рішення передбачають створення комплексних систем, що об'єднують різні класи ферментів у межах єдиного процесу [20]. Інтеграція ліпаз, гідролаз та фенолоксидаз із редуктазами й трансферазами дозволяє одночасно видаляти декілька груп забруднювачів: від органічних сполук до важких металів .

Ефективність таких систем безпосередньо корелює з використанням іммобілізованих мікроорганізмів. Результативність ферментативних процесів у такому разі визначається параметрами носія , способом закріплення біомаси [21].

Функціонування ферментних систем суттєво залежить від стабільності факторів зовнішнього середовища. Такі показники, як температура, рН та концентрація субстрату, визначають рівень каталітичної активності [20].

Перспективним та новітнім є розвиток галузі генетичної інженерії. Використання генно-модифікованих мікроорганізмів, здатних продукувати специфічні ферменти, дозволяє значно підвищити інтенсивність детоксикації [22]. Практична апробація таких рішень демонструє успішне видалення

органічних розчинників, іонів металів, а також підвищення ефективності утилізації біомаси [22].

1.3. Ендофітні бактерії та їх екологічне значення

1.3.1. Поняття ендофітів та їх різноманіття

Ендофітні мікроорганізми представляють специфічну категорію мікробів, які заселяють внутрішнє середовище рослинних тканин, не викликаючи патологічних проявів і встановлюючи з організмом-господарем довготривалі мутуалістичні або індіферентні відносини [23]. Становлення наукового бачення щодо ендофітів відбулося завдяки впровадженню молекулярно-генетичного аналізу рослинного мікробіому, що відкрило можливість ідентифікувати великий масив некультивованих мікробних форм усередині тканин [26]. Нинішня інтерпретація терміна «ендофіт» базується не тільки на безпосередньому перебуванні мікроорганізму в рослині, а й на специфіці його біологічного зв'язку з нею [24]. Вказані мікроорганізми можуть перебувати у стані мутуалізму, коменсалізму чи латентного патогенезу, водночас перехід між цими типами взаємодії є варіабельним і визначається чинниками довкілля [25].

Проникнення мікроорганізмів у рослинний організм здійснюється крізь кореневу систему, продиховий апарат або зони механічної деструкції тканин [27]. Доведено, що коріння функціонує як специфічний «біологічний фільтр», здійснюючи вибіркову селекцію мікробних агентів із загального ґрунтового резервуару [26, 28]. Ендофітна мікрофлора коренів зазвичай характеризується нижчим рівнем біорізноманіття порівняно з ризосферною мікрофлорою, що підтверджує активний характер відбору з боку господаря [26]. У складі мікробіому кореневої ендосфери домінують переважно представники *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* та *Bacteroidetes* [26]. Водночас археї та окремі поширені у ґрунті групи, такі як *Acidobacteria*, виявляються у внутрішньому середовищі тканин істотно рідше [26].

Ендофітні організми локалізуються в усіх рослинних органах, включаючи кореневу систему, стебла, листові пластинки, репродуктивні органи та насіннєвий матеріал [25, 27]. Певна частка мікробів транслюється вертикальним шляхом крізь насіння, що закладає фундамент для розвитку базового мікробіому молодих проростків [24]. Решта популяції інкорпорується з довкілля безпосередньо під час індивідуального розвитку рослинного організму [25]. Процес колонізації може охоплювати як апопластний простір, так і проникати всередину клітинних структур [27]. Транспортування бактеріальних клітин по всьому організму господаря переважно відбувається за допомогою провідних пучків ксилеми та флоєми [27].

Таксономічний склад ендофітних спільнот охоплює бактеріальні культури, археї та мікроскопічні гриби [24]. Грибні ендофіти, що належать переважно до відділів *Ascomycota* та *Basidiomycota*, встановлюють довготривалі зв'язки з рослинними організмами різних екологічних стратегій [29]. Вони мають здатність синтезувати вторинні метаболіти, які посилюють резистентність господаря до впливу фітофагів та збудників хвороб [29]. Деякі представники грибних ендофітів сприяють зростанню толерантності рослин до абіотичних стрес-факторів, зокрема дефіциту вологи, високої мінералізації субстрату та високих температурних режимів [30].

Особлива значущість у новітніх наукових працях надається вивченню прокаріотичних ендофітів. Бактеріальні форми складають вагомую частку мікробіому ендосфери та виступають ключовими регуляторами процесів онтогенезу рослин [25]. Найбільш поширеними серед цієї групи є представники таких родів, як *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Azospirillum* та *Streptomyces* [25, 26]. Для бактеріальних ендофітів характерна значна метаболічна лабільність та здатність до експресної адаптації до умов внутрішньотканинного середовища [24].

Прокаріотичні ендофіти мають здатність інтенсифікувати ростові процеси рослин шляхом продукування фітогормонів, передусім індол-3-оцтової кислоти, цитокінінів та гіберелінів [31]. Вказані мікроорганізми забезпечують

покращення мінерального статусу господаря через механізми фіксації молекулярного азоту та трансформації важкодоступних фосфатів у мобільні форми [31]. Окремі мікробні штами стимулюють розвиток системної стійкості, запускаючи відповідні захисні сигнальні реакції в рослинному організмі [30]. До того ж бактеріальні ендofіти відіграють вагомую роль у адаптації до несприятливих абіотичних чинників, зокрема високих температур, дефіциту вологи чи надмірного засолення субстрату [30].

Структура ендofітного консорціуму детермінується генетичними особливостями рослини, едафічними характеристиками, кліматом, а також методами агротехнічного впливу [26, 28]. Трансформації у складі мікробіому спостерігаються впродовж усього періоду онтогенезу господаря [26].

1.3.2. Механізми колонізації рослин

Процес заселення рослинних тканин ендofітними мікроорганізмами є складним багатоступеневим циклом, що охоплює контакт із поверхнею, проникнення крізь бар'єри та сталий внутрішній розвиток без патогенного впливу на господаря [32]. Ендofіти здатні до системного поширення в різних органах: від кореневої системи до листків та насіння. Результативність цього процесу залежить від синергії мікробних характеристик, генетичного потенціалу рослини та екологічних умов [32]. Фундаментальні передумови для закріплення в ендосфері включають у себе: мобільність клітин, їх адгезивні властивості, здатність адаптуватися до специфічного внутрішнього мікросередовища [33].

Первинна взаємодія зазвичай ініціюється в ризосфері, де кореневі виділення відіграють роль хемотаксичних стимулів [33]. Бактеріальні клітини мігрують до поверхні кореня, реагуючи на градієнти органічних сполук. Цю рухливість забезпечує джгутиковий апарат, який є важливим на початковій фазі колонізації. Після зближення з епідермісом відбувається адгезія за участю екзополісахаридів [33]. Формування біоплівки гарантує надійну фіксацію

мікроорганізмів, підвищує їхню резистентність до стресів і дозволяє координувати групову поведінку.

Інкorporація у внутрішні тканини здійснюється крізь природні отвори рослин. Окремі ендofіти синтезують ферменти, що локально модифікують клітинну стінку рослини, не спричиняючи її деструкції [32]. На відміну від фітопатогенів, такі гідролітичні агенти не викликають некрозів і дозволяють уникати масованої імунної реакції [33].

Після проникнення мікроорганізми стикаються з агресивним окисним середовищем апопласту. У відповідь на вторгнення рослина генерує активні форми кисню [32]. Для нівелювання окисативного стресу ендofіти активують системи антиоксидантного захисту. Рослинні рецептори розпізнають мікробних агентів та запускають експресію захисних генів [32]. Проте ендofіти здатні коригувати інтенсивність цієї відповіді, викликаючи лише слабку та транзиторну продукцію [34].

Колонізація може мати як локальний, так і системний характер, тобто поширюючись через судинну систему або апопласт [32]. Тканинна специфікація залежить від генотипу обох організмів, а також від фізіологічного стану та віку рослини. Щільність інокулюму впливає на швидкість стабілізації популяції в ендосфері [33]. Вертикальний шлях передачі через насіння забезпечує присутність симбіонта наступних поколінь.

Внутрішнє середовище рослин обмежене в поживних ресурсах, тому для виживання ендofіти задіюють специфічні транспортні та метаболічні системи [34]. Ця метаболічна пластичність мікрофлори дозволяє тривалий час співіснувати з господарем без шкоди для його розвитку. Рівень обміну речовинами визначає тип взаємодії - мутуалізм чи латентність [32].

До прокаріотичних ендofів належать представники родів *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* та іншими [33]. Їхня стратегія базується на поєднанні мобільності, адгезії та високої стресостійкості [33]. Представники *Bacillus* утворюють спори, що полегшує їх виживання в ґрунті до моменту інфікування

рослини через зони росту [33]. Бактерії родів *Enterobacter* та *Klebsiella* вирізняються потужним ферментативним захистом від окиснення [32].

1.3.3. Ендофітні бактерії астрагалу

Ендофітна мікробіота виступає невід'ємним елементом мікробіому представників роду *Astragalus*, справляючи визначальний вплив на їхні адаптаційні можливості, рівень продуктивності та фармакологічні характеристики. В кореневій ендосфері *Astragalus membranaceus* зосереджені різноманітні консорціуми грибів та бактерій, які виступають регуляторами фізіологічного статусу, зміцнюють резистентність до несприятливих абіотичних факторів і детермінують процеси біосинтезу вторинних сполук [35]. Окреме значення мають темносептовані ендофіти, які встановлюють тривалі симбіотичні зв'язки з корінням, інтенсифікують роботу антиоксидантних систем, зокрема ферментів каталази, пероксидази та супероксиддисмутази, а також корегують метаболізм рослини в періоди дефіциту вологи та під час подальшого відновлення водного балансу [35].

За умови тривалого культивування *Astragalus mongholicus* на одному місці відбуваються глибокі трансформації в структурі мікробіому ризосфери та ендосфери, що призводять до зменшення біомаси, поширення патогенної мікрофлори та порушення балансу у мікробних консорціумах [36]. Зміни мікробного профілю детерміновані модифікацією складу корневих виділень та акумуляцією речовин, що здатних інгібувати розвиток рослин і порушувати життєдіяльність ґрунтових мікроорганізмів [36].

Значуща роль у регулюванні процесів онтогенезу належить азотфіксувальним та ризосферним бактеріям, які мають здатність впливати на вторинний метаболізм рослинного організму. Впровадження мікробних культур у посіви *Astragalus mongholicus* ініціює експресію генів, що відповідають за синтез сапонінів, флавоноїдів та інших біоактивних сполук, а також гармонізує структуру мікробіому кореневої системи [38]. Доведено, що застосування

азотфіксувальних штамів для інокуляції сприяє нарощуванню біомаси, поліпшує загальний фізіологічний статус рослин та інтенсифікує продукування цінних фармакологічних компонентів [38].

Аналіз природних популяцій *Astragalus verus* вказує на те, що внутрішні структури цієї рослини виступають специфічною екологічною нішею для різноманітних прокаріотів, зокрема адаптованих бактеріальних агентів, що встановлюють тісні асоціативні зв'язки з організмом-господарем [37], це підтверджує функціональну багатогранність мікробного різноманіття астрагала.

Специфічну категорію ендofітів формують представники роду *Bacillus*, які регулярно ідентифікують у ризосферній зоні та ендосфері астрагала. Ці мікроорганізми вирізняються здатністю до споруляції, а також синтезом фітогормонів, гідролітичних ензимів та сполук з антимікробною активністю. У межах азотфіксувальних комплексів штами *Bacillus* проявили значну результативність у стимулюванні розвитку коренів та забезпеченні приросту загальної фітомаси [38].

Механізми їхньої сприятливої дії базуються на продукуванні індол-3-оцтової кислоти, солубілізації неорганічних фосфатів, секреції сидерофорів та антифунгальних агентів, що гарантує супресію ґрунтових фітопатогенів разом із ініціацією імунних механізмів господаря. До того ж бактерії роду *Bacillus* здатні здійснювати опосередкований вплив на структурування стабільного мікробіому та координацію процесів вторинного метаболізму, що має важливе значення для фармакологічно цінних видів астрагала [38].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Методи виділення ендофітних бактерій

2.1.1. Виділення ендофітів на рослинному матеріалі

В якості вихідного матеріалу використовували комерційно придбане насіння *Astragalus dasyanthus*. Для забезпечення асептичних умов культивування *in vitro* посівний матеріал піддавали поетапній поверхневій стерилізації. На початковому етапі насіння занурювали у 70% розчин етилового спирту на 30 секунд для дезінфекції поверхні. Надалі проводили витримування матеріалу у 4% розчині гіпохлориту натрію протягом 7 хвилин, що дозволило ефективно знешкодити патогенну мікрофлору. Для повного видалення залишків дезінфікуючих речовин насіння проходило трикратну послідовну промивку в стерильній дистильованій воді, тривалістю по 7 хвилин кожна [39].

Насіння висівали на середовище Гамбурга (B5) [40] без додаткових фітогормонів.

Таблиця 1.1

Склад живильного середовища Гамбурга (B5) [40]

Компонент	Концентрація
Макроелементи (г/л)	
KNO_3	2,5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25
$((NH_4)_2SO_4)$	0,134
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0,15
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,15

Таблиця 1.1

Склад живильного середовища Гамбурга (B5) [40]

Компонент	Концентрація
Мікроелементи (мг/л)	
H_3BO_3	3,0
$MnSO_4 \cdot H_2O$	10,0
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2,0
KI	0,75
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8
Na_2-EDTA	37,3
Вітаміни та органічні добавки (мг/л)	
Тіамін гідрохлорид (B_1)	10,0
Піридоксин гідрохлорид (B_6)	1,0
Нікотинова кислота (PP)	1,0
Інозитол	100,0
Інші компоненти (г/л)	
Сахароза	25
Агар	10

Для приготування середовища використовуються маточні розчини, що готуються окремо. Для приготування маточних розчинів використовують дистильовану воду та реактиви високої чистоти. Маточний розчин мікроелементів готують шляхом послідовного розчинення солей у воді. Спочатку розчиняють марганцю сульфат ($MnSO_4 \cdot H_2O$ - 10 мг/л у фінальному середовищі), потім борну кислоту (H_3BO_3 - 3 мг/л), цинку сульфат ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 2 мг/л), натрію молібдат ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ - 0,25 мг/л), міді сульфат ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,025 мг/л) та кобальту хлорид ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$ - 0,025 мг/л), цей розчин роблять у 100 разів концентрованішим і зберігають у холодильнику. Маточний розчин вітамінів готують, розчиняючи нікотинову кислоту (1 мг/л), піридоксину гідрохлорид (1 мг/л) та тіаміну гідрохлорид, цей маточний розчин є також у 100 разів концентрованішим та його потрібно зберігати у замороженому стані. Залізо готують у вигляді хелату. Розчиняють натрієву сіль ЕДТА (Na_2-EDTA) та заліза сульфат ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) у гарячій воді, щоб забезпечити повне зв'язування іонів заліза. Макроелементи зважують безпосередньо перед приготуванням, де основну увагу приділяють нітрату калію (KNO_3 - 2500 мг/л), який забезпечує основне джерело азоту.

У підготовлену дистильовану воду, об'єм якої має становити приблизно 80% від запланованої фінальної кількості розчину, першочергово вносять розраховані кількості маточних розчини макросолей, щоб забезпечити розчинення кожного компонента середовища готують на магнітній мішалці. Наступним етапом є додавання аліквот заздалегідь підготовлених маточних розчинів мікроелементів та хелату заліза, після чого вводиться розчин кальцію хлориду ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), який додається повільно для запобігання випаданню осаду фосфатів. Після введення мінеральної основи до суміші додають органічні компоненти -інозитол, вітаміни і сахарозу як джерело вуглецю.

Коли всі інгредієнти повністю розчинені, за допомогою 0,1 н розчинів $NaOH$ та HCl проводиться потенціометричне коригування показника pH до значень 5,5–5,8. Після досягнення оптимального показника pH об'єм

середовища доводиться дистильованою водою до кінцевої позначки також на цьому етапі додається агар-агар (10 г/л), який розчиняють шляхом нагрівання суспензії.

Останнім етапом підготовки середовища є термічна стерилізація методом автоклавування. Готове середовище розливають у відповідний лабораторний посуд, герметично закривають та піддають впливу насиченої пари під тиском. Стерилізація проводиться при температурі 121°C (тиск 1 атм) протягом 15–20 хвилин, що забезпечує повну інактивацію мікробіологічних агентів. Після експозиції тиск в автоклаві поступово знижують до атмосферного, а середовище охолоджують до кімнатної температури та перед подальшою роботою у стерильних умовах ламінарного боксу.

Процедуру висіву насіння здійснювали в умовах жорсткої асептики всередині ламінарного боксу з вертикальним потоком стерильного повітря через НЕРА-фільтр. Для маніпуляцій використовували стандартний набір мікробіологічних інструментів- пінцетит та скальпелі. Попередню стерилізацію інструментарію проводять у сухожаровій шафі, інструменти попередньо занурювали у бікс, для запобігання контамінації, та поміщали у шафу за температури 180°C ,60 хвилин.

Зважаючи на наявність щільної водонепроникної насінневої оболонки, характерної для цього представника, перед висівом на живильне середовище проводили механічну скарифікацію. Процедура полягала у нанесенні мікронасічок на оболонку за допомогою стерильного скальпеля. Такий підхід сприяв інтенсифікації поглинання води та газообміну, що є необхідною умовою для стимуляції однорідного проростання [41]. Підготовлене насіння висівають на поверхню агаризованого живильного середовища, дотримуючись щільності посіву по 30 насінин для кожного флакону з підготовленим живильним середовищем. Після герметизації посуду культури переносили до світлової кімнати, де підтримували стабільний температурний режим на рівні 24 ± 2 °C.

Вирощування здійснювали за контрольованого фотоперіоду 16/8 год (світло/темрява) з використанням люмінесцентних ламп денного світла.

У міру розвитку проростків та появи першої пари справжніх листків рослин було пересаджено в індивідуальні стерильні банки з відповідним за складом середовищем для проведення подальших морфометричних спостережень. Під час процедури субкультивування частину рослинного матеріалу було піддано навмисному механічному пошкодженню тканин. Цей методичний прийом застосовували для стимуляції виходу ендofітних мікроорганізмів із внутрішніх тканин астрагала на поверхню агаризованого середовища. Подальша поява специфічних мікробних колоній навколо пошкоджених експлантів була зафіксована як позитивний результат ізоляції ендofітів, а отримані ізоляти стали вихідним матеріалом для виконання мікробіологічного дослідження ідентифікації ендofітних бактерій.

2.1.2. Виділення ендofітів за допомогою насіння

Для виділення та культивування ендofітних бактерій використовували поживний агар (ПА), приготовлений на основі сухого середовища. Наважку порошку розчиняли у дистильованій воді згідно з інструкцією, нагрівають при постійному перемішуванні до повного розчинення агару та коригували показник рН до $7,2 \pm 0,2$. Стерилізацію середовища проводили в автоклаві при температурі 121°C протягом 20 хвилин, після чого в асептичних умовах ламінарного боксу його розливали у стерильні чашки Петрі. Паралельно готували фосфатно-сольовий буфер (PBS) із точної наважки порошку реактиву, який також піддавали автоклавуванню за аналогічного режиму (121°C , 1 атм, 20 хв) для забезпечення повної стерильності реакційного середовища.

Процедуру ізоляції ендofітної мікрофлори з насіння *Astragalus dasyanthus* розпочинали з його поверхневої стерилізації: насіння витримували у 70% етанолі (30 с), потім у 4% розчині гіпохлориту натрію (7 хв) із подальшою трикратною

промивкою стерильною водою. Стерилізоване насіння переносили у пробірки типу «Eppendorf» із додаванням 1 мл стерильного буфера PBS та піддавали інтенсивному механічному пошкодженню стерильною скляною паличкою для вивільнення внутрішньотканинних бактерій у рідину. Отриману суспензію в об'ємі 100 мкл висівали на поверхню ПА за допомогою шпателя Дригальського, для рівномірного розподілу суспензії по твердому агаризованому середовищі. Для подальшого дослідження мікрофлори астрагалу посіви інкубували у термостаті при температурі 30 °C протягом 20 годин до появи візуально помітних колоній.

2.2. Ідентифікація ендofітних бактерій

2.2.1. Візуальна оцінка колоній

Первинним етапом мікробіологічного дослідження став візуальний аналіз бактеріальних колоній, що були виділені з тканин *Astragalus dasyanthus*. Під час проведення субкультивування експлантів на середовищі Гамбурга (B5) було помічено формування специфічних бактеріальних структур, що свідчило про успішну ізоляцію мікрофлори. Оскільки ендofітні мікроорганізми зазвичай перебувають у симбіотичному або латентному стані всередині рослини, їх масовий вихід на поверхню агаризованого середовища став можливим завдяки зміні умов культивування, а саме пошкодження тканин рослини, що слугувало природним стимулом для накопичення бактерій у зовнішньому середовищі, поза рослиною.

Оцінка морфології проводилася шляхом безпосереднього огляду рослин при денному світлі для точного визначення характеристик. Було встановлено, що колонії, які утворилися на поверхні, мали характерне біло-молочне забарвлення, що є типовим для багатьох представників ґрунтової та ендofітної мікрофлори. Поверхня отриманих колоній була рівною та гладенькою, без вираженої складчастості. Важливою діагностичною ознакою стала слизька консистенція

біомаси, що вказувало на активне продукування екзометаболітів, що надавали колоній цих мікроорганізмів відповідної морфологічної характеристики. Такий тип росту мікроорганізмів часто корелює зі здатністю їх до адгезії та колонізації рослинних тканин у природних умовах. Звертаючи увагу на відсутність пігментації іншого кольору, окрім біло-молочного забарвлення, можна припустити, що вихідний матеріал є однорідний за цією ознакою. Отримана інформація при візуальному спостереженні стала базою для подальшої диференціації мікроорганізмів за допомогою мікроскопічних та біохімічних лабораторних методів дослідження виявлених об'єктів.

2.2.2. Фарбування за грамом

Для глибшого вивчення морфологічних та біохімічних властивостей ізолятів було застосовано класичне фарбування за методом Грама. Це є фундаментальний метод в мікробіології, який дозволяє розділити бактерії на дві великі групи залежно від будови їхньої клітинної стінки. Для забезпечення стандартизації умов та високої точності результатів у роботі використовували вже придбаний комерційний набір реактивів для фарбування за Грамом, що містив основний барвник генціанвіолет, розчин Люголя, спиртовий розчин для деколоризації та контрастний барвник сафранін. Хід виконання розпочинаємо з приготування тонкого бактеріального мазка на стерильному предметному склі, який після висушування на повітрі піддавали термічній фіксації над полум'ям пальника. На фіксований препарат наносили генціанвіолет на 1 хвилину, після чого змивали його та обробляли розчином Люголя для утворення міцного комплексу барвника з йодом усередині клітин. Наступним етапом у ході роботи є деколоризація етиловим спиртом протягом 15–30 секунд, яка дозволяла диференціювати клітини за здатністю утримувати барвник. Для завершення фарбування потрібно нанести сафранін на 1 хвилину для дофарбовування знебарвлених структур, після чого препарат промивали водою та висушували.

Після проведення процедури фарбування було виявлено, що досліджувана

культура являється змішаною. Мікроскопічне дослідження під імерсійною системою дозволило ідентифікувати кілька морфологічних типів клітин. Зокрема, у полі зору спостерігалися клітини сферичної форми (коки) та паличкоподібні структури (бацили). Також було виявлено ендоспори, які візуалізувалися як незабарвлені або слабко забарвлені овальні включення всередині бацил. Всі виявлені морфотипи демонстрували стійкий грам-позитивний статус, фарбуючись у фіолетовий колір. Це свідчило про наявність товстого шару пептидоглікану в оболонках цих бактерій. Наявність ендоспор у грам-позитивних паличок свідчило про належність у змішаній культурі бактерій, що належать до роду *Bacillus*. Саме ці бактерії становлять найбільший інтерес для подальшого вивчення процесів біоремедіації через їхню природну стійкість.

Статус грам-позитивних спороутворювачів є важливою характеристикою для ідентифікації та подальшого дослідження патогенних або корисних властивостей виділених ендоспорів.

2.2.3. Виділення чистої культури *Bacillus* spp.

Отримання чистої культури бактерій роду *Bacillus* вимагало застосування специфічних методів, що базуються на унікальних фізіологічних властивостях цих мікроорганізмів. Основним інструментом селекції став метод термічного шоку [41], який дозволяє ефективно відокремити життєздатні спори від вегетативних клітин інших бактерій.

На першому етапі було виконано агаровий змив з поверхні агаризованого середовища з виділеними колоніями. Отриманий матеріал перенесли у стерильний епендорф, забезпечуючи асептичні умови на кожному кроці, це забезпечувалося роботою у ламінарному боксі та за допомогою попередньо простерилізованих матеріалів та інструментів. Для створення стабільного середовища до змиву додали 1 мл фосфатно-сольового буфера (PBS). Суспензію піддали ретельній гомогенізації, це є важливим для рівномірного розподілу бактеріальних клітин та спор у всьому об'ємі рідини. Після підготовки зразки

помістили у попередньо розігріту водяну баню. Режим термічної обробки становив 10 хвилин при температурі 80 °C. Така температура є летальною для більшості вегетативних форм бактерій, проте ендоспори бацил легко витримують подібний вплив завдяки своїй багат шаровій оболонці. По завершенні експозиції епендорфи охолоджували, щоб мінімізувати ризик термічного пошкодження самих спор після зняття стресового фактора.

Наступним кроком був висів обробленої суспензії на нове живильне середовище для їх пропостання. На цьому етапі використовували попередньопротволене та простерилізоване ПА з сухого концентрату. Після інкубації було проведено повторне фарбування за Грамом для контролю якості ізоляції. Результати підтвердили успішність процедури - у мазках спостерігалася виключно монокультура грам-позитивних бацил. Морфологічні ознаки нових колоній повністю збігалися з описаними раніше параметрами роду *Bacillus*. Здатність ізолюваної культури до швидкого відновлення та спороутворення є причиною віднести їх до саме цієї таксономічної належності. Отримана чиста культура була зафіксована як робочий об'єкт для тестів на редукцію токсичних сполук.

2.3. Тест на здатність до редукції $KMnO_4$

2.3.1. Приготування модифікованого середовища

Процес приготування модифікованого поживного середовища розпочинаємо з підготовки базової основи, для цього використовуємо комерційний сухий порошок поживного агару (ПА) промислового виробництва. Відповідно до інструкції виробника, необхідну наважку сухого препарату ретельно розчиняли у визначеному об'ємі дистильованої води, забезпечуючи повну гомогенізацію суміші шляхом постійного перемішування. Для стабілізації фізико-хімічних властивостей середовища отриману суспензію піддають помірному нагріванню у мікрохвильовій печі до повного розчинення агару, після чого приступали до етапу модифікації субстрату модельним забрудником.

Як модельну сполуку для оцінки біоремедіаційного потенціалу ендофітних штамів було обрано перманганат калію ($KMnO_4$), який вводили безпосередньо у підготовлене рідке середовище у формі попередньо підготовленого розчину. Розрахунок маси солі проводили з урахуванням створення ряду робочих концентрацій, а саме: 1 г/л, 5 г/л, 10 г/л та 15 г/л, що дозволяло в подальшому дослідити концентраційно-залежну редукцію за участю мікроорганізмів. Після внесення перманганату калію середовище ретельно збовтували до досягнення рівномірного інтенсивного забарвлення розчину, що свідчило про повне розчинення кристалів окисника.

Наступним етапом проводили стерилізацію підготовленого середовища, яку здійснювали методом автоклавування за стандартних параметрів тиску та температури (1 атм, 121°C) протягом 20 хв, що гарантувало знищення сторонньої мікрофлори без суттєвої термічної деградації компонентів. Паралельно з цим проводили підготовку лабораторного посуду, зокрема чашок Петрі, які піддавали сухожаровій стерилізації для забезпечення асептичних умов експерименту. Усі подальші маніпуляції з розливу середовища та безпосередньої роботи з мікробіологічними об'єктами виконували в умовах ламінарного боксу з попередньо простерилізованою робочою поверхнею.

Після завершення циклу автоклавування середовище охолоджували до температури близько 45–50°C, що запобігало надмірній конденсації вологи на кришках чашок Петрі при розливі. Модифікований агар порційно розподіляли по стерильних чашках Петрі, дотримуючись принципу трикратної повторності для кожної з досліджуваних концентрацій $KMnO_4$ з метою отримання статистично достовірних результатів. Після повного застигання агару чашки маркували для проведення наступних етапів дослідження.

2.3.2. Посів чистої культури та інкубація

Для проведення досліджень використовували заздалегідь підготовлену чисту культуру ендофітних бактерій роду *Bacillus*, виділену з рослинних тканин

Astragalus d. . Процедуру посіву здійснювали методом штриха, що дозволяє отримати ізольовані колонії та чітко візуалізувати зони метаболічної активності бактерій. Основним інструментом для інокуляції слугувала бактеріологічна петля, яку попередньо прожарювали у полум'ї пальника до червоного розжарення для повної дезінфекції. Охолодженою петлею відбирали невелику кількість біомаси з поверхні агару та рівномірно розподіляли її по поверхні модифікованого ПА зигзагоподібними рухами.

Особливу увагу приділяли щільності нанесення штриха, щоб забезпечити оптимальну площу контакту мікроорганізмів із модельним забрудником у товщі середовища. Після завершення інокуляції чашки Петрі герметично закривали та переносили до термостата, де підтримували сталу температуру інкубації на рівні 30°C. Протягом усього періоду експозиції проводили щоденний візуальний моніторинг динаміки росту культури та морфологічних змін у субстраті. Основним критерієм здатності *Bacillus spp.* до біоремедіації вважали появу зон просвітлення навколо колоній, що інтерпретували як процес біохімічної редукції калій перманганату та перехід до інших хімічних форм.

2.4. Кількісне визначення іонів мангану спектрофотометричним методом

2.4.1. Фотометричне визначення концентрації іонів мангану(II)

Кількісне визначення іонів мангану(II) у дослідних зразках здійснювали із застосуванням спектрофотометричного методу, що дозволяє оцінити концентрацію аналіту за показниками оптичної густини розчину. Для проведення дослідження готували селективне рідке поживне середовище, до якого додавали відповідні аліквоти реагентів з метою формування початкових концентрацій мангану на рівні 0,003; 0,03 та 0,3 г/л.

Експеримент проводили за сталого значення кислотності середовища - pH 6,2, що відповідає слабкокислим умовам і є сприятливим для прояву метаболічної активності мікроорганізмів. Культивування тривало протягом 24-48 годин при

температурі 28 °С. Для підвищення достовірності результатів усі досліди виконували у трикратній повторюваності. Інтенсивність росту бактеріальної культури оцінювали за зміною оптичної густини суспензії (OD_{600}), яку вимірювали при довжині хвилі 600 нм у кюветах із товщиною оптичного шару 1 см. Перед проведенням вимірювань зразки ретельно гомогенізували для забезпечення їх однорідності. Як контроль використовували стерильне поживне середовище без внесення мікроорганізмів.

Визначення концентрації мангану(II) ґрунтувалося на попередньому окисненні Mn^{2+} до сполук із вираженими світлопоглинальними властивостями. У кислому середовищі за участю окисника - персульфату амонію - відбувалося перетворення іонів мангану у форму, що характеризується інтенсивним забарвленням у видимій області спектра. Оптичну густину отриманих розчинів реєстрували при довжині хвилі 520-530 нм у стандартних кюветах [42, 43].

2.4.2. Побудова калібрувального графіка

Для визначення концентрації Mn^{2+} використовували калібрувальну залежність, побудовану на основі стандартних розчинів, що являли собою рідкі середовища із відомим вмістом мангану. Залежність між оптичною густиною та концентрацією описувалася лінійною функцією, що відповідає закону Бугера–Ламберта–Бера(A):

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

де A - оптична густина розчину, ε - молярний коефіцієнт поглинання, l - товщина шару розчину, c - концентрація перманганат-іонів.

Отримані значення використовували для розрахунку залишкової концентрації іонів мангану після експериментального впливу. Ефективність вилучення металу оцінювали шляхом порівняння початкових і кінцевих концентрацій у середовищі.

Усі експерименти проводили у трьох повтореннях, а результати подавали як середнє значення з стандартним відхиленням ($M \pm SD$), що характеризує відтворюваність і надійність методу. Статистичну обробку здійснювали стандартними методами математичної статистики, а достовірність відмінностей між середніми визначали за рівнем значущості $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Оцінка біоремедіаційних властивостей ендоефітних бактерій рослин

Astragalus dasyanthus

У ході проведених досліджень було виділено ендоефітну бактерію з рослини *Astragalus dasyanthus* та здійснено оцінку її потенційних біоремедіаційних властивостей у модельній системі *in vitro*. У процесі культивування рослин було зафіксовано появу бактеріальних колоній на поверхні живильного середовища після механічного пошкодження рослинних тканин. Це свідчить про наявність ендоефітної мікрофлори, яка перебувала всередині тканин рослини та вийшла на поверхню середовища після порушення бар'єрних структур.

Морфологічний аналіз колоній показав, що вони мають біло-молочне забарвлення, гладку поверхню та слизисту консистенцію. Первинне фарбування за Грамом продемонструвало грампозитивний характер клітин. Подальший аналіз виявив наявність паличкоподібних клітин та спороутворюючих форм.

За сукупністю морфологічних та цитологічних ознак було зроблено припущення про належність ізолюваної культури до бактерій роду *Bacillus*. Представники цього роду є широко поширеними у природних екосистемах та часто входять до складу ендоефітної мікрофлори рослин. Для них характерні паличкоподібна форма клітин, грампозитивна клітинна стінка та здатність до утворення ендоспор. Ці властивості забезпечують бактеріям високу екологічну пластичність і дозволяють їм виживати у широкому діапазоні умов середовища, включаючи середовища з підвищеною концентрацією токсичних речовин. Саме тому бактерії *Bacillus* часто розглядаються як перспективні мікроорганізми для використання у біоремедіаційних технологіях [44].

Крім того, ендоефітні бактерії можуть формувати взаємовигідні взаємодії з рослинами-господарями. Вони здатні синтезувати різноманітні біологічно активні речовини, стимулювати ріст рослин, а також підвищувати їхню стійкість до дії токсичних сполук. Саме ці властивості роблять ендоефітні бактерії

перспективними об'єктами досліджень у галузі фіторемедіації та екологічної біотехнології [45].

3.2. Оцінка життєздатності бактерій методом підрахунку колонієутворюючих одиниць

Для додаткової оцінки впливу концентрації іонів мангану на життєздатність ендофітного штаму бактерій роду *Bacillus* було використано класичний мікробіологічний метод підрахунку колонієутворюючих одиниць (КУО). Посіви здійснювали на тверде поживне середовище, що містило іони мангану у концентраціях 0,003; 0,03 та 0,3 г/л. Дослідження проводили у трикратній повторюваності.

Таблиця 3.1

Вплив концентрації іонів мангану на кількість колонієутворюючих одиниць (КУО)

Концентрація <i>Mn</i> , г/л	КУО (середнє)
0,3	26
0,03	192
0,003	144

Після інкубації підраховували кількість сформованих колоній, які відображають число життєздатних клітин у зразках. Встановлено, що при максимальній концентрації мангану (0,3 г/л) кількість колоній становила 26 КУО, що свідчить про значне пригнічення росту бактерій за умов високого металевого навантаження. При зниженні концентрації мангану до 0,03 г/л кількість колоній зростала до 192 КУО, що вказує на сприятливіші умови для росту та активного

поділу клітин. За найнижчої концентрації (0,003 г/л) було зафіксовано 144 КУО, що також характеризує достатньо високий рівень життєздатності культури.

Отримані результати свідчать про дозозалежний вплив іонів мангану на бактерії: підвищення концентрації металу призводить до зниження кількості життєздатних клітин. Водночас встановлено, що навіть за високих концентрацій Mn^{2+} досліджуваний штам зберігає здатність до росту, що підтверджує його стійкість до металевого стресу.

3.3. Дослідження здатності бактерії *Bacillus* до редукції перманганату калію

Одним із етапів дослідження була оцінка здатності ізольованої бактерії до редукції перманганату калію ($KMnO_4$), який використовувався як модельна окиснювальна сполука для вивчення властивостей мікроорганізму до біоакумуляції та біодеградації токсикантів.

Перманганат калію є сильним окисником і має широке використання для біохімічних дослідженнях як індикатор процесів відновлення. У природних умовах подібні окисно-відновні реакції відіграють важливу роль у трансформації різних неорганічних сполук, включаючи метали, що можуть виступати забруднювачами довкілля.

Під час інкубації культури *Bacillus* на поживному агарі, доповненому $KMnO_4$, було зафіксовано утворення зон знебарвлення у місцях росту бактеріальних колоній. Первісно середовище мало характерне інтенсивне темно-фіолетове забарвлення, яке обумовлене присутністю іонів перманганату MnO_4^- . У зоні активного росту бактерій спостерігалось поступове зменшення інтенсивності забарвлення. Формування світлих або безбарвних ділянок свідчить про перебіг процесу відновлення перманганату до менш забарвлених або нерозчинних форм сполук марганцю. У мікробних системах подібні процеси зазвичай пов'язані з діяльністю ферментативних систем клітини, які забезпечують перенесення електронів у процесі метаболічних реакцій. Найбільш

швидке знебарвлення середовища спостерігалось при концентрації $KMnO_4$ 1 г/л. У цьому випадку перші ознаки редукції були помітні вже через 12 годин після початку інкубації. Це свідчить про високу метаболічну активність бактерій у відносно сприятливих умовах, коли концентрація окисника не перевищує межу толерантності клітин. Зі збільшенням концентрації перманганату калію швидкість знебарвлення поступово зменшувалася. При максимальній досліджуваній концентрації (15 г/л) повна зона знебарвлення формувалася приблизно через 18 діб інкубації. Подібна залежність характерна для більшості процесів мікробної детоксикації. При підвищенні концентрації токсичних сполук спостерігається зниження швидкості метаболічних процесів мікроорганізмів, що пов'язано з пригніченням ферментативної активності клітин та порушенням клітинного метаболізму.

Незважаючи на це, бактерії роду *Bacillus* відзначаються високою стійкістю до несприятливих факторів середовища. Це пояснюється їхньою здатністю утворювати ендоспори, які характеризуються високою резистентністю до температурних, хімічних та інших стресових факторів [43]. Крім того, ці бактерії мають розвинені системи антиоксидантного захисту та ферментативні механізми детоксикації різних сполук.

3.4. Кількісна зміна концентрації іонів Mn^{2+} після культивування бактерій

За результатами спектрофотометричного аналізу встановлено зниження вмісту іонів Mn^{2+} у всіх експериментальних зразках після інкубації мікроорганізмів. Отримані дані підтверджують детоксикаційну здатність штаму *Bacillus*, що реалізується через механізми біосорбції або внутрішньоклітинного накопичення. Спостережуване зниження концентрації іонів мангану свідчить про активне включення клітин у процеси взаємодії з металом та його трансформації. Всі результати аналізу представлені у вигляді таблиці.

Таблиця 3.2

Динаміка вмісту іонів мангану в середовищі після інкубації ендофітного штаму *Bacillus* при pH 6,2

Початкова конц. <i>Mn</i>, г/л	<i>Mn</i>²⁺ після культивування, г/л ($M \pm SD$)	Вилучення <i>Mn</i>, %
0,3	$0,18 \pm 0,01$	40
0,03	$0,017 \pm 0,001$	43
0,003	$0,0015 \pm 0,0001$	50

Найвищі показники очищення спостерігалися за умов нижчого концентраційного навантаження. Зокрема, при початковій концентрації мангану 0,03 г/л ступінь вилучення становив 43%, що супроводжувалося суттєвим зниженням залишкової концентрації металу у середовищі до $0,017 \pm 0,001$ г/л. Це свідчить про достатньо високу ефективність біологічного вилучення мангану за помірного вмісту іонів Mn^{2+} . За підвищення початкової концентрації мангану до 0,3 г/л ефективність процесу знижувалася. У цьому випадку ступінь вилучення становив 40%, а залишкова концентрація металу після культивування залишалася значно вищою ($0,18 \pm 0,01$ г/л), що вказує на обмеження ефективності очищення за умов підвищеного металевого навантаження.

Зниження ступеня вилучення при зростанні концентрації мангану пояснюється насиченням активних центрів на поверхні бактеріальних клітин. Імовірно, за високого вмісту іонів металу відбувається часткове блокування функціональних груп клітинної стінки, що знижує інтенсивність їх взаємодії з Mn^{2+} та обмежує процеси біосорбції.

Аналіз показав, що в усіх дослідних варіантах після культивування спостерігалася зменшення концентрації мангану у середовищі. Встановлені зміни мали статистично значущий характер ($p < 0,05$) порівняно з початковими значеннями, що підтверджує надійність виявленого ефекту біовилучення.

Водночас простежується чітка закономірність: зі зниженням початкової концентрації мангану зменшуються і абсолютні значення його залишкового вмісту у розчині. Так, при концентрації 0,03 г/л залишковий вміст Mn^{2+} є значно нижчим порівняно з варіантом 0,3 г/л, що свідчить про вищу ефективність очищення за меншого субстратного навантаження.

3.5. Порівняння отриманих результатів з даними літератури та значення для біоремедіації

Отримані в ході дослідження результати узгоджуються з сучасними літературними даними щодо високого біоремедіаційного потенціалу бактерій роду *Bacillus*, зокрема їх здатності до біотрансформації та детоксикації токсичних неорганічних сполук. Встановлено, що представники цього роду можуть ефективно відновлювати токсичні форми важких металів до менш токсичних і менш біодоступних форм, що є ключовим механізмом зниження екологічного ризику.

Зокрема, у дослідженнях показано, що бактерії *Bacillus* здатні відновлювати селенати $Se(VI)$ до елементарного селену, який характеризується низькою розчинністю та біодоступністю. У роботі встановлено, що *Bacillus cabrialesii* утворює наночастинки елементарного селену, які накопичуються як внутрішньоклітинно, так і позаклітинно, що свідчить про активне функціонування редукційних механізмів та можливість їх використання для очищення забруднених середовищ [46]. Така трансформація значно знижує токсичність селену та обмежує його міграцію в екосистемах.

Аналогічні закономірності спостерігаються і для сполук хрому. Встановлено, що *Bacillus licheniformis* здатний ефективно відновлювати високотоксичний $Cr(VI)$ до $Cr(III)$, який є менш розчинним і менш мобільним у природних умовах. При цьому показано, що деякі штами можуть повністю відновлювати значні концентрації $Cr(VI)$ (до 500 ppm) протягом 48 годин, що

свідчить про їх високий потенціал для застосування у біоремедіаційних технологіях [47]. Важливо, що цей процес супроводжується як внутрішньоклітинними, так і поверхневими механізмами взаємодії з металом, включаючи адсорбцію та ферментативне відновлення.

Результати даного дослідження узгоджуються з роботами, в яких доведено ефективність використання бактерій роду *Bacillus* для ремедіації ґрунтів, забруднених органічними токсикантами, зокрема нафтовими вуглеводнями. Встановлено, що внесення бактеріальних препаратів сприяє інтенсивному розкладанню вуглеводнів (до 64–67% зниження їх вмісту) та відновленню біологічної активності ґрунту, що проявляється у підвищенні ферментативної активності та чисельності мікроорганізмів [48]. Це свідчить про універсальність метаболічних можливостей представників роду *Bacillus* щодо трансформації як неорганічних, так і органічних забруднювачів.

Особливу увагу слід приділити ролі ендofітних бактерій у процесах біоремедіації. Завдяки здатності колонізувати внутрішні тканини рослин, вони формують тісні симбіотичні взаємозв'язки, що сприяють підвищенню стійкості рослин до токсичних факторів середовища. Ендofіти можуть брати участь у трансформації токсикантів безпосередньо в рослинному організмі або в ризосфері, знижуючи їх фітотоксичність. У свою чергу, рослина забезпечує мікроорганізми поживними речовинами та стабільним середовищем існування, що підвищує ефективність біоремедіаційних процесів.

Таким чином, узагальнення отриманих результатів підтверджує, що бактерії роду *Bacillus* є перспективними агентами для розробки екологічно безпечних біотехнологій очищення довкілля.

ВИСНОВКИ

Проведені дослідження дозволяють зробити наступні висновки:

1. Розроблено методику введення *Astragalus dasyanthus* у культуру *in vitro* із використанням живильного середовища Гамбурга (B5), що забезпечило отримання стерильного рослинного матеріалу для подальшого виділення ендоефітної мікрофлори.

2. Із тканин та насіння рослин виділено ендоефітні мікроорганізми, які за морфологічними ознаками та фарбуванням за Грамом ідентифіковано як представників роду *Bacillus* із здатністю до спороутворення.

3. Дослідження життєздатності бактерій за різних концентрацій іонів мангану показало дозозалежну реакцію - при 0,3 г/л - 26 КУО, при 0,03 г/л - 192 КУО, при 0,003 г/л - 144 КУО, що свідчить про пригнічення росту за високих концентрацій та оптимальний розвиток за помірних.

4. Експериментально підтверджено здатність штамів *Bacillus* до редукції перманганату калію ($KMnO_4$), що проявлялось у знебарвленні середовища внаслідок активних окисно-відновних процесів.

5. Спектрофотометричний аналіз показав зниження концентрації Mn^{2+} , з 0,3 до $0,18 \pm 0,01$ г/л (40%), з 0,03 до $0,017 \pm 0,001$ г/л (43%), з 0,003 до $0,0015 \pm 0,0001$ г/л (50%), що свідчить про зростання ефективності біовилучення зі зменшенням концентрації токсиканта.

6. Встановлено, що ефективність біоремедіації обмежується високими концентраціями металів, однак штам зберігає життєздатність і здатність до трансформації забруднювача, що підтверджує його стійкість до токсичних факторів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Стойко С. М., Койнова І. Б. Сучасні види антропогенного впливу на життєве середовище. *Український географічний журнал*. 2012. № 1. С. 50–57.
2. Балюк С. А., Воротинцева Л. І., Соловей В. Б., Шимель В. В. Реалії українського чорнозему: сучасний стан, еволюція, охорона та стале управління. *Вісник аграрної науки*. 2023. № 3 (840). С. 5–16.
3. Беліцький О. С., Полукаров Ю. О. Екологічні наслідки підриву греблі Каховської ГЕС. *Збірник матеріалів Міжнародної науково-практичної конференції «Екологічна безпека та збалансоване природокористування в агропромисловому комплексі»*. 2023. С. 28–31.
4. Безпека життєдіяльності та цивільний захист : навч. посіб. / В. В. Пилипенко та ін. ; за ред. В. В. Пилипенка. Полтава : ПНПУ імені В. Г. Короленка, 2020. 574 с.
5. Носко В. Л. Екологічні ризики застосування пестицидів в агроєкосистемі. *Наука і освіта в інтелектуально-інноваційному розвитку суспільства* : матеріали Міжнар. наук.-практ. конф. (м. Бережани, 16–17 травня 2019 р.).
6. Диняк О. В., Кошлякова І. Є. Потенційна небезпека для довкілля та населення від нафтохімічного забруднення геологічного середовища внаслідок бойових дій. *Екологічні науки*. 2023. № 6 (51). С. 136–140.
7. Грабенко О. С., Хіцька О. А. Ксенобіотики, їх класифікація та прояв дії. *Актуальні проблеми ветеринарної медицини «Наукові пошуки молоді у ХХІ столітті»* : матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. магістрантів і молодих дослідників (м. Біла Церква, 16 листопада 2023 р.). Біла Церква : БНАУ, 2023. С. 138.
8. Мулярчук О. І. Вплив важких металів на ріст та розвиток рослин. *Новітні технології у науковій діяльності і навчальному процесі* : матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. Чернігів, 2021. С. 316–318.

9. Найдьонова О. Є. Динаміка чисельності мікрофлори і біохімічної активності чорнозему типового за застосування комплексу пестицидів. *Агрохімія і ґрунтознавство*. 2020. С. 65–75.

10. Yaashikaa P. R., Senthil Kumar P., Saravanan A., Vo D.-V. N. Advances in biosorbents for removal of environmental pollutants: A review on pretreatment, removal mechanism and future outlook. *Journal of Hazardous Materials*. 2021. Vol. 420, 126596.

11. Vaishali A., Babita K. Conventional and Contemporary Techniques for Removal of Heavy Metals from Soil. *IntechOpen*. 2021.

12. Wong J.W.C., Fang M., Li G.X., Wong M.H. Feasibility of using coal ash residues as co-composting materials for sewage sludge // *Environmental Technology*. 2002.

13. Легенчук Р. В., Циганенко-Дзюбенко І. Ю., Скиба Г. В. Перспективи та технологічні ризики процесу біоконверсії органо-мінеральних добрив з мулових відкладів занедбаних меліоративних систем. *Природничий альманах. Біологічні науки*. 2025. № 2.

14. Thakare M., Sarma H., Datar S., Roy A., Pawar P., Gupta K., Pandit S., Prasad R. Understanding the holistic approach to plant-microbe remediation technologies for removing heavy metals and radionuclides from soil. *Current Research in Biotechnology*. 2021. Vol. 3. P. 84-98.

15. Ahmad I., Zhu G., Zhou G., Liu M., Ahmad S., Murad W., Stokes C.E., Ahmad A., Habib A. Biochar particle size coupled with biofertilizer enhances soil carbon-nitrogen microbial pools and CO₂ sequestration in lentil // *Frontiers in Environmental Science*. 2023. Vol. 11.

16. Черниш Є. Ю., Скворцова П. О., Штепа В. М. Біосорбційні технології в системах детоксикації довкілля. *Екологія. Довкілля. Енергозбереження* : зб. матеріалів II Міжнар. наук.-практ. конф. Полтава : Нац. ун-т ім. Юрія Кондратюка, 2021. С. 378–381.

17. Li J., Yang H., Tong L., Sand W. Some Aspects of Industrial Heap Bioleaching Technology: From Basics to Practice. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review*. 2021. Vol. 43, Issue 4.

18. Chernysh Y., Chubur V., Ablicieva I., Skvortsova P., Yakhnenko O., Skydanenko M., Plyatsuk L., Roubik H. Soil Contamination by Heavy Metals and Radionuclides and Related Bioremediation Techniques: A Review. *Soil Systems*. 2024. Vol. 8, Issue 2.

19. Sari D.K., Hidayat N., Fajriah S., Wijaya A. Optimization of fermentation condition to produce liquid organic fertilizer (LOF) from rotten vegetable waste using response surface methodology // *Chemical Engineering and Technology*. 2023. Vol. 46. Issue 7. P. 1425-1432.

20. Feng S., Gao W., Ding A., Parsa S.M., Pan J., Cheng D., Tung T.V., Ngo H.H. // *Chemical Engineering Journal*. 2025.

21. Kuppan N., Padman M., Mahadeva M., Srinivasan S., Devarajan R. // *Waste Management Bulletin*. 2024.

22. Darwesh O.M., Matter I.A., Eida M.F. // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2019.

23. Перепелиця Л. О., Корево Н. І., Гуторчук С. Л. Словник-довідник з фітопатології : для підготов. фахівців першого (бакалавр.) рівня вищої освіти. Житомир : Вид-во ЖДУ ім. І. Франка ; ТОВ «ТВОРИ», 2023. 36 с.

24. Hardoim P. R., van Overbeek L. S., Berg G. et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2015. Vol. 79, No. 3. P. 293–320.

25. Liu H., Carvalhais L. C., Crawford M. et al. Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2017. Vol. 8. Article 2552.

26. Bulgarelli D., Schlaeppi K., Spaepen S., van Themaat E. V. L., Schulze-Lefert P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2013. Vol. 64. P. 807–838.

27. Compant S., Clément C., Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*. 2010. Vol. 42. P. 669–678.
28. Edwards J., Johnson C., Santos-Medellín C. et al. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2015. Vol. 112. P. E911–E920.
29. Rodriguez R. J., White J. F., Arnold A. E., Redman R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*. 2009. Vol. 182. P. 314–330.
30. Pieterse C. M. J., Zamioudis C., Berendsen R. L. et al. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*. 2014. Vol. 52. P. 347–375.
31. Glick B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*. 2012. Vol. 2012. Article ID 963401.
32. Mengistu A. A. Endophytes: Colonization, Behaviour, and Their Role in Defense Mechanism // *International Journal of Microbiology*. 2020. Vol. 2020. Article ID 6927219.
33. Santoyo G., Moreno-Hagelsieb G., Orozco-Mosqueda M. C., Glick B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes // *Microorganisms*. 2016. Vol. 4, No. 3. Article 24.
34. Agriculture. Plant Endophytes and Their Role in Sustainable Agriculture // *Agriculture*. 2024. Vol. 14. Article 769.
35. Xie Y. et al. Characterization of Dark Septate Endophytes Under Drought and Rehydration and Their Compensatory Mechanisms in *Astragalus membranaceus*. *Microorganisms*. 2024.
36. Zhou Q. et al. Impacts of continuous cropping on the rhizospheric and endospheric microbial communities and root exudates of *Astragalus mongholicus*. *BMC Plant Biology*. 2024.
37. Astaraki S. et al. *Astragalus* verus, a miracle in de-desertification or a surprising niche for ecologically adaptable bacteria? *BMC Plant Biology*. 2026.

38. Shi Z. et al. Unveiling microbial-plant interactions via multi-omics: A nitrogen-fixing agent enhances *Astragalus mongholicus* growth and medicinal properties for sustainable culture. *Industrial Crops & Products*. 2026.
39. Tomaszewska-Sowa M., Figas A. Optimization of the processes of sterilization and micropropagation of cup plant (*Silphium perfoliatum* L.) from apical explants of seedlings in in vitro cultures. *Acta Agrobotanica*. 2012. Vol. 64, no. 4. P. 3–10.
40. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 1968. Vol. 50, no. 1. P. 151–158.
41. Kvasko O., Manzhura O. FEATURES OF IN VITRO CULTIVATION OF *ASTRAGALUS DASYANTHUS* PALL PLANTS. *Biological Systems: Theory and Innovation*. 2024. Vol. 15, no. 1.
42. Qin Y., Liu H., Li X., Zhao Y. Endophytic *Bacillus* species enhance plant tolerance to heavymetals through biosorption and bioaccumulation mechanisms / Y. Qin, H. Liu, X. Li, Y. Zhao // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2022. – Vol. 106, №9. – P. 3741–3753.
43. Raza, A., et al. (2024). *Co-inoculation of manganese-tolerant Bacillus amyloliquefaciens and its impact on antioxidant defense systems of woody plants*. *Plant Physiology and Biochemistry*
44. Parker N. et al. *Microbiology*. Houston: OpenStax, Rice University, 2016. 1345 p.
45. Li H.-Y. et al. Endophytes and their role in phytoremediation. *Fungal Diversity*. 2012. Vol. 54. P. 11–18.
46. Hossny N. E., Ismaeil M., Saeed A. M. Bioremediation and optimization of selenate reduction by a novel *Bacillus cabrialesii* strain. *BMC Microbiology*. 2025. Vol. 25.
47. Survival tactics of *Bacillus licheniformis* under hexavalent chromium stress. *Frontiers in Microbiology*. 2025.

48. Minnikova T. et al. The influence of remediation with *Bacillus* and *Paenibacillus* strains on petroleum-contaminated soil. *Agriculture*. 2023. Vol. 13.