

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології**

**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**

Завідувач кафедри  
фізіології, біохімії рослин та  
біоенергетики

\_\_\_\_\_ Світлана ПРИЛУЦЬКА

«\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 р.

**БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

**на тему «Функціональні властивості мікроміцетів роду *Trichoderma* перспективних для створення біоперепаратів»**

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**Гарант освітньої програми**

Кандидат біологічних наук,  
доцент кафедри екобіотехнології  
та біорізноманіття

\_\_\_\_\_ Олена КВАСКО  
(підпис)

**Керівник бакалаврської кваліфікаційної  
роботи**

Кандидат сільськогосподарських  
наук, доцент кафедри фізіології,  
біохімії рослин та біоенергетики

\_\_\_\_\_ Наталія НЕСТЕРОВА  
(підпис)

**Співкерівник в установі  
к.б.н., с.н.с.**

\_\_\_\_\_ Алла ЛЕВІШКО  
(підпис)

**Виконала**

\_\_\_\_\_ Софія ГУЛІК  
(підпис)

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології  
Кафедра фізіології, біохімії рослин та біоенергетики  
Освітній ступінь «Бакалавр»  
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»**

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри  
фізіології, біохімії рослин та біоенергетики  
\_\_\_\_\_ Світлана ПРИЛУЦЬКА  
“ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2025 р.

**З А В Д А Н Н Я**

**на виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи студентки**

Гулік Софії Вікторівни

1. Тема роботи Функціональні властивості мікроміцетів роду *Trichoderma* перспективних для створення біопрепаратів  
керівник роботи к.с.-г.н., доцент Нестерова Наталія Георгіївна \_\_\_\_\_
2. Строк подання студенткою роботи 20 травня 2025 року \_\_\_\_\_
3. Вихідні дані до роботи: перелік літератури, методичні вказівки для визначення ферментативної активності та біохімічні тести на властивості *Trichoderma spp.* до деструкції лігноцелюлозного кокомплексу \_\_\_\_\_
4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): аналіз літератури щодо ферментативних властивостей мікроміцетів та переваги й недоліки створення біопрепаратів на їх основі; виділення та культивування *Trichoderma spp.* на поживному середовищі; визначення ферментативної активності ізолятів; дослідження целюлозолітичних ферментів біохімічними тестами \_\_\_\_\_
5. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1	к.с.-г.н., доцент Нестерова Н.Г.; к.б.н., с.н.с. Левішко А.С.	06.09.2024	06.09.2024
2	к.с.-г.н., доцент Нестерова Н.Г.; к.б.н., с.н.с. Левішко А.С.	15.11.2024	15.11.2024
3	к.с.-г.н., доцент Нестерова Н.Г.; к.б.н., с.н.с. Левішко А.С.	27.01.2025	27.01.2025

6. Дата видачі завдання 1 вересня 2024 року \_\_\_\_\_

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Огляд літератури відповідно до теми кваліфікаційної роботи	Вересень-листопад	
2	Підбір матеріалів та методів	Листопад-грудень	
3	Проведення лабораторних досліджень та аналіз результатів	Січень-березень	
4	Висновки та оформлення роботи	Квітень-травень	

**Завдання прийняла до виконання**

\_\_\_\_\_

( підпис )

**Софія ГУЛІК**

**Керівник**

**кваліфікаційної роботи**

\_\_\_\_\_

( підпис )

**Наталія НЕСТЕРОВА**

**Співкерівник в установі**

\_\_\_\_\_

( підпис )

**Алла ЛЕВІШКО**

## РЕФЕРАТ

Робота складається з 56 сторінок друкованого тексту, містить в собі вступ, три розділи. Також вона має 14 рисунків, 4 з яких це графіки, 5 таблиць висновки, список джерел та додатки.

**Мета роботи** – дослідження целюлозолітичних властивостей грибів роду *Trichoderma*

### **Завдання дослідження:**

- Проаналізувати літературні джерела щодо морфолого-біохімічних особливостей роду *Trichoderma* та їхньої здатності до целюлозолітичної активності.
- Ізолювати та ідентифікувати *Trichoderma spp.* з ґрунтових зразків методом серійних розведень на селективному живильному середовищі.
- Дослідити здатність ізолятів до деструкції целюлозовмісного субстрату та визначити рівень целюлозолітичної активності за продукцією ферментів.

**Об'єкт дослідження** – мікроміцети роду *Trichoderma*

**Предмет дослідження** – ферментативна активність *Trichoderma spp.* та її прояв у процесах ферментативної деструкції целюлози.

### *Результати дослідження:*

- Проаналізувавши літературні джерела дослідили механізм біологічної деструкції лігноцелюлозного комплексу, розглянули основні мікроорганізми, здатні до синтезу ферментів, що деградують комплекс. Детально вивчили морфологію та ферментативні властивості *Trichoderma spp.*, а також біопрепарати створені на основі досліджуваного мікроміцета, їх переваги та недоліки.
- Виділили досліджуваний об'єкт з ґрунту та культивували на поживному середовищі, відібрали 5 ізолятів, після розглянули морфолого-культуральні ознаки та ідентифікували мікроміцети. Колонії швидко росли, мали

- округлу форму з чіткими краями, спочатку мали білуватий колір, після набували зеленого або оливкового.
- Для дослідження ферментативної активності модифікували середовище Чапека, де замість джерела вуглецю був фільтрувальний папір з метою змусити ізоляти до індукції целюлозолітичних ферментів. Після 5 днів культивування за формулою (2.1) вираховували ступінь деструкції. Найбільший ступінь мав ізолят під номером 3, найменший – 4. Після порівняння з контролем можемо стверджувати, що мікроміцети здатні до деградації целюлози.
  - Після підтвердження продукування ферментів ізолятами приступали до біохімічних тестів на екзоглюканазну, ендоглюканазну, загальну целюлазну активність та  $\beta$ -глюкозидазу. Для кожного з тестів культивували ізоляти протягом 21 дня і спостерігали за їх активністю. В усіх чотирьох тестах найбільш активний був 3 ізолят, найменш – ізолят під номером 4, що було очікувано з попередніх результатів.
  - Експериментально було доведено та підтверджено ефективність деградації лігноцелюлозного комплексу мікроміцетами роду *Trichoderma*.

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	9
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	11
1.1. Механізм деструкції целюлози та мікроорганізми, які її здійснюють .....	11
1.1.1. Ферментативні механізми розщеплення целюлози .....	11
1.1.2. Мікроорганізми-деструктори целюлози.....	14
1.2. Біологічні особливості мікроскопічних грибів роду <i>Trichoderma</i> .....	15
1.2.1. Систематичне положення, поширення, розмноження та морфологічні характеристики .....	15
1.2.2. Культуральні ознаки .....	17
1.2.3. Сполуки, що синтезуються мікроміцетами роду <i>Trichoderma</i> .....	18
1.3. Біопрепарати для розкладання рослинних решток на основі <i>Trichoderma</i> <i>spp.</i> та механізм їх дії.....	22
1.4. Проблеми та перспективи застосування препаратів на основі мікроорганізмів роду <i>Trichoderma</i> .....	265
1.4.1. Проблеми .....	26
1.4.2. Перспективи.....	27
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ</b> .....	30
2.1 Виділення мікроміцетів роду <i>Trichoderma</i> .....	30
2.1.1. Поживне середовище Чапека .....	30
2.1.2. Відбір ґрунтових зразків .....	32
2.1.3 Приготування ґрунтової суспензії .....	33
2.1.4. Посів на середовище .....	34
2.2 Ідентифікація <i>Trichoderma spp.</i> .....	35
2.2.1 Мікроскопія .....	35
2.2.2. Приготування препаратів для мікроскопії .....	37
2.3 Визначення ферментативної активності .....	39
2.3.1 Культивування <i>Trichoderma</i> та індукція синтезу ферментів .....	38
2.3.2 Біохімічні тести .....	39
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ</b> .....	42

	8
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>48</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>49</b>
<b>ДОДАТКИ.....</b>	<b>54</b>

## ВСТУП

У XXI столітті людство дедалі активніше шукає альтернативу традиційним технологіям, які спричиняють надмірне навантаження на довкілля. В умовах зростаючої екологічної нестабільності, виснаження природних ресурсів і погіршення стану ґрунтів особливої актуальності набувають біотехнології, що ґрунтуються на використанні природних агентів – мікроорганізмів, які здатні виконувати складні функції переробки органіки, відновлення біорізноманіття та стимулювання росту рослин без залучення шкідливих хімічних речовин.

Однією з найбільш перспективних груп серед таких мікроорганізмів є мікроміцети роду *Trichoderma* – ґрунтові гриби, добре відомі завдяки своїй ферментативній активності, здатності до антагонізму щодо фітопатогенних мікроорганізмів і позитивному впливу на рослинний організм. За останні десятиріччя вони стали об'єктом пильної уваги як у фундаментальній, так і прикладній науці. Особливе місце в дослідженнях займає вивчення здатності *Trichoderma* до деструкції лігноцелюлозного комплексу — одного з найбільш розповсюджених і водночас стійких до розкладання біополімерів на Землі.

Мікроміцети роду *Trichoderma* мають здатність синтезувати широкий набір гідролітичних і оксидоредуктазних ферментів, що дає їм змогу ефективно руйнувати всі основні компоненти лігноцелюлозного комплексу. Серед них варто відзначити такі ферменти, як целюлази, ксиланази, мананази, лактази, пероксидази та інші. Завдяки цьому *Trichoderma* здатні не тільки перетворювати складну органічну речовину на доступні для інших організмів сполуки, а й створювати сприятливі умови для покращення структури ґрунтів, збагачення їх корисною мікробіотою, зменшення фітопатогенного навантаження. Ці властивості роблять їх привабливими кандидатами для створення багатофункціональних біопрепаратів нового покоління.

Актуальність теми дослідження полягає в необхідності глибшого вивчення механізмів лігноцелюлозної деструкції мікроміцетами роду *Trichoderma*, з метою їх практичного застосування у створенні біологічних засобів для переробки органічних відходів, підвищення родючості ґрунтів та зменшення використання

хімічних добрив і пестицидів. Такий підхід відповідає сучасним тенденціям розвитку біотехнологій та сприяє вирішенню низки актуальних екологічних і аграрних проблем.

Мета дослідження полягає у всебічному аналізі функціональних властивостей мікроміцетів роду *Trichoderma*, зокрема їхньої здатності до деструкції лігноцелюлозного комплексу, для обґрунтування доцільності їх застосування як основи для створення екологічно безпечних, ефективних та багатоцільових біопрепаратів.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Механізм деструкції целюлози та мікроорганізми, які її здійснюють

#### *1.1.1. Ферментативні механізми розщеплення целюлози*

Целюлоза – це один з найпоширеніших природних біополімерів, що являє собою лінійний гомополісахарид до складу якого входять  $\beta$  та d-глюкопіранозні мономери. Останні, в свою чергу, з'єднані за допомогою  $\beta$ -1-4-зв'язків. Структура та фізичні властивості полісахариду обумовлені наявністю трьох гідроксильних груп. Варто зазначити, що целюлоза не фіксується в природі як окрема молекула, а є частиною лігноцелюлозного комплексу.

Природна целюлоза, тобто целюлоза I – кристалічна, поділяється на 2 поліморфа (триклінна структура Ia та моноклінна структура Ib). Перша з наведених форм може бути перетворена на другу за допомогою обробки лугом. Целюлоза II стабільна, проте зазвичай вона відсутня в природі. Не зважаючи на це, її синтезують з целюлози I шляхом регенерації, чи мерсеризації. Целюлозу III та IV отримують з целюлози I, чи II із залученням хімічної обробки.

Лігнін є складним тривимірним полімером, що включає ефірні групи і пропілфенольні групи з'єднані одинарним зв'язком. Він відповідає за стійкість волокон целюлози шляхом підвищення їх жорсткості. Геміцелюлоза – гетерогенний, низькомолекулярний та аморфний полісахарид який містить ксилани, ксилоглюкани, глюкоманнани та маннани. Він забезпечує зв'язування гідрофільної целюлози та гідрофобного лігніну в тканинах рослинних організмів. Геміцелюлоза та лігнін складають 20-30% та 15-25% від усього хімічного складу волокон целюлози.

Існує первинна та вторинна стінка целюлозних волокон. Остання поділяється на 3 шари. Первинна клітинна стінка містить 10-35% пектинів, приблизно 9-25% мікрофібрил целюлози та 25-50% геміцелюлози. Вторинна клітинна стінка складається з найбільшого числа целюлози (40-80%), та

найменшої кількості лігніну (5-25%). Вміст геміцелюлоз є середнім (10-40%). Діаметр кожної целюлозної мікрофібрили варіюється в діапазоні 2-20 нм [1].

Деградація целюлози – доволі складний процес в основі якого лежить необхідність синергетичної взаємодії окремих груп ферментів. Виокремлюють два шляхи розщеплення целюлози: біохімічний та хімічний. Згідно з науковими даними, біохімічний підхід є ефективнішим, тому що його наслідком є руйнування вуглеводів. При використанні термохімічного методу подібних змін не спостерігається. Ферменти мікроорганізмів, що розкладають целюлозу, належать до класу целюлаз.

Стандартний механізм деструкції целюлози є можливим завдяки трьом ферментним системам які перетворюють вихідну сполуку на мономер – глюкозу. До них відносять  $\beta$ -1,4-глюкозидази (целобіази), ендо- $\beta$ -1,4-глюканази (ендоцелюлази), екзоцелюлази (цеобіогідролази). Спираючись на те, що вторинні метаболіти є гідролазами, вони руйнують глікозидні зв'язки за допомогою додавання молекули води.

Ендоцелюлази розщеплюють молекулу целюлози у випадкових зонах та атакують її аморфну ділянку. Ендоглюканази умовно поділяють на процесивні та непроцесивні. Ендогідролази приймають участь у формуванні редукуючих та нередукуючих кінців ланцюга. Надалі ці структури піддаються впливу екзоглюканаз. Потім на утворений продукт діють  $\beta$ -1,4-глюкозидази.

Як ендо-, так і екзоглюканази відповідають за деструкцію целюлози в разі її знаходження в твердій фазі. В свою чергу, глюкозидази спричиняють розщеплення біополімеру в рідкій фазі. Відзначають два шляхи гідролізу молекули групою ферментів. Перший – інверсія, а другий – збереження аномерної конфігурації в зоні розкладання. Інверсія характеризується додатковим видаленням молекули води. Другий механізм спричиняє подвійне заміщення із формуванням проміжної сполуки – глікозил-ферменту [2].

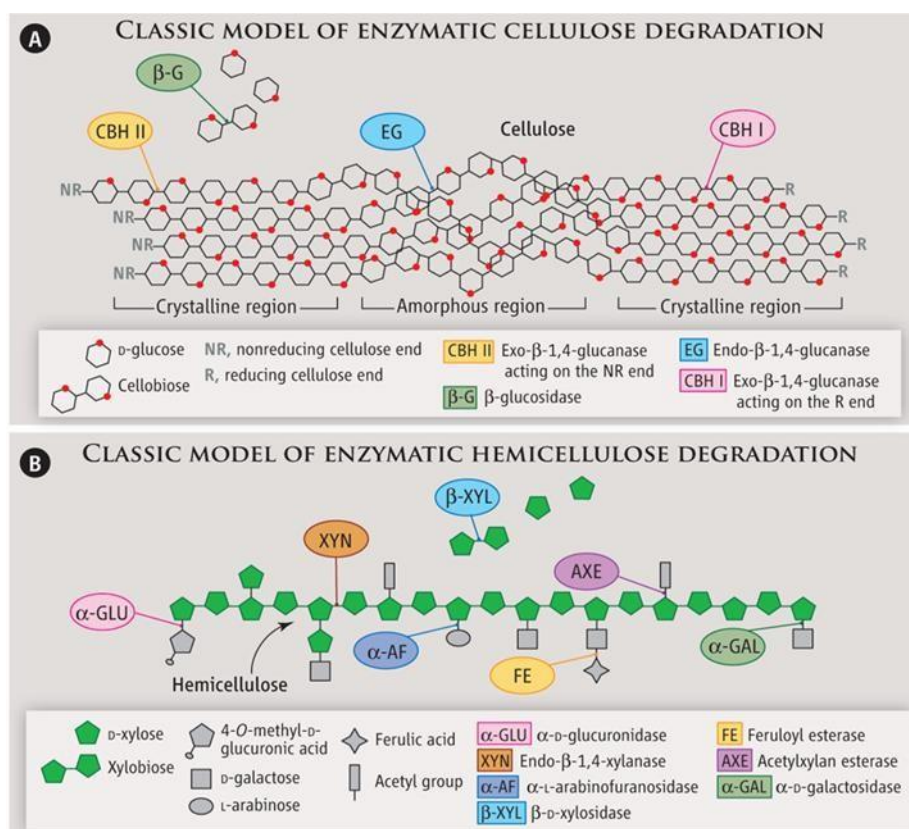


Рис. 1.1 Модель ферментативної деградації за місцем дії в целюлозі та геміцелюлозі [3].

Як відомо, сукупна дія ферментів під час процесу целюлолізу є більш ефективною за рахунок підвищення швидкості перебігу процесу, ніж прояв їх окремої ферментативної активності. Ендоглюканози збільшують кількість ділянок, які підлягають екзонуклеазному розкладанню в контексті синергізму цих ферментів. Взаємодія одразу трьох ферментів (ендоглюканози, целобіогідролази та  $\beta$ -1,4-глюкозидази) супроводжується результативною деструкцією целюлози. Окрім цього, спостерігається взаємовигідна дія ендоцеллюлаз та  $\beta$ -глюкозидаз, тому що підвищується швидкість деградації [2].

Таким чином, біохімічне розщеплення целюлози, спровоковане дією ферментативних систем мікроорганізмів залишається складним процесом, який є ефективним за умови синергетичної взаємодії.

### 1.1.2. Мікроорганізми-деструктори целюлози

Існує велика кількість мікроміцетів та бактерій, що володіють здатністю до розщеплення полісахаридів. Хоча існує загальний механізм целюлолізу, число та активність ферментів, що синтезуються мікроорганізмами, різняться.

Багато грибних агентів виступають продуцентами целюлаз. Вони включають аеробних та анаеробних представників. Частиною цієї групи є аскоміцети (*Trichoderma reesei*) та базидоміцети (*Fomitopsis palustris*) певний відсоток яких росте та розвивається у безкисневих умовах. Серед мікроміцетів м'якої гнилі найбільш розповсюдженими та вивченими є *Trichoderma spp.* Іншими представниками є *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa* [4].

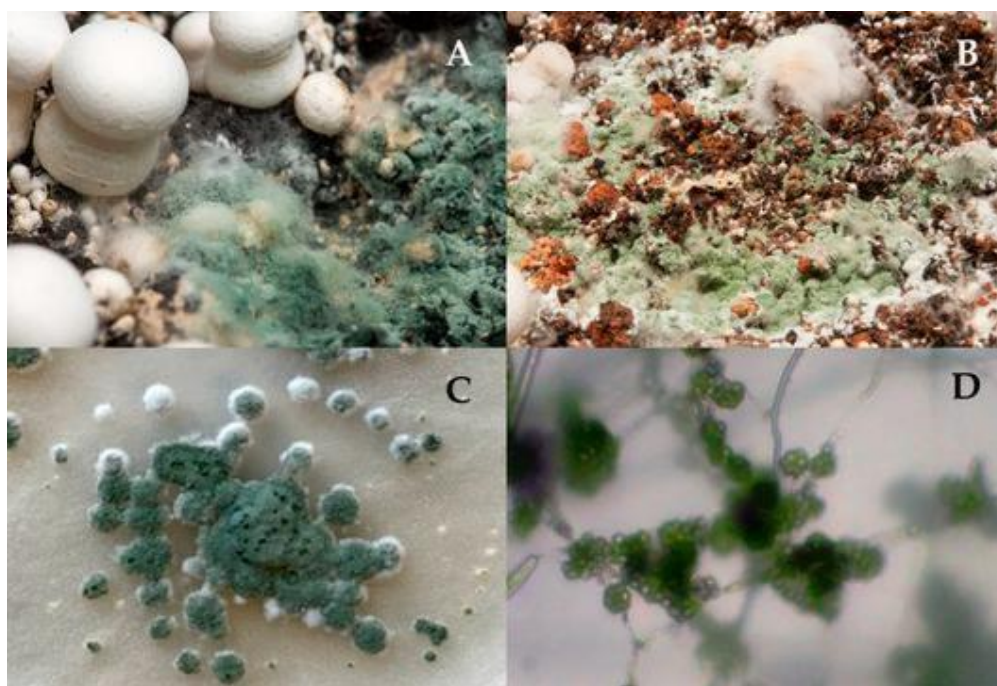


Рис. 1.2. М'яка гниль, що викликана ізолятом *Trichoderma aggressiveum f. europaeum TAET1* (А, В), мікроміцет в культурі (С) та конідієносці

Звернути увагу потрібно на гриби бурої та білої гнилі. Види бурої гнилі результативно гідролізують целюлозу в момент раннього розкладання деревини. Це обумовлено відсутністю одних з основних ферментів – екзоглюканаз. *Lenzites trabea*, *Tyromyces palustris*, *Poria placenta*, *Coniophora puteana* є представниками

бурої гнилі. Мікроміцети білої гнилі відповідають за деструкцію лігноцелюлозного комплексу. До них належать *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Sporotrichum thermophile*. Дослідженими підтверджують, що анаеробними грибами, які розкладають целюлозу є *Orpinomyces spp.*, *Neocallimastix frontalis*, *Piromyces communis*.

Целюлозолітичні бактерії не вирізняються здатністю синтезувати велику кількість целюлаз, але розщеплення субстрату є можливим внаслідок продукції різноманітних ферментів, що діють синергетично.

Найвідоміші бактерії-деструктори полісахариду – це *Cellulomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Acinetobacter spp.*. Переважна більшість біохімічних реакцій, які опосередковані бактеріями, фіксуються в аеробних умовах (90-95%). Інша частка (5-10%) здійснюється в безкисневому середовищі. Певні мікроорганізми, що локалізуються в ШКТ, синтезують целюлази, які руйнують складові клітинної стінки. *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Proteus spp.* відносяться до таких бактеріальних агентів. Термофільні види (*Geobacillus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Anoxybacillus spp.*) приймають участь в целюлолізі [4].

Отже, ферменти, які є основними в процесі біодеградації полісахариду, продукують бактеріальні та грибні види, що ростуть в різному діапазоні температур, а також при наявності, чи відсутності кисню. Більша частка мікроорганізмів виконує процес целюлолізу в аеробних умовах, але невеликий відсоток припадає на анаеробну деструкцію.

## **1.2. Біологічні особливості мікроскопічних грибів роду *Trichoderma***

### ***1.2.1. Систематичне положення, поширення, розмноження та морфологічні характеристики***

Рід *Trichoderma* налічує більше 30 видів. Перша літературна згадка назви роду датована 1794 роком. Для представників притаманна відсутність

конкретного статевого стану. Особливість корелюється з втратою можливості завершувати статевий цикл. Тобто розмноження мікроміцетів є безстатевим, за участі спор та конідій [5].

Таблиця 1.1

**Систематичне положення *Trichoderma spp.* [6].**

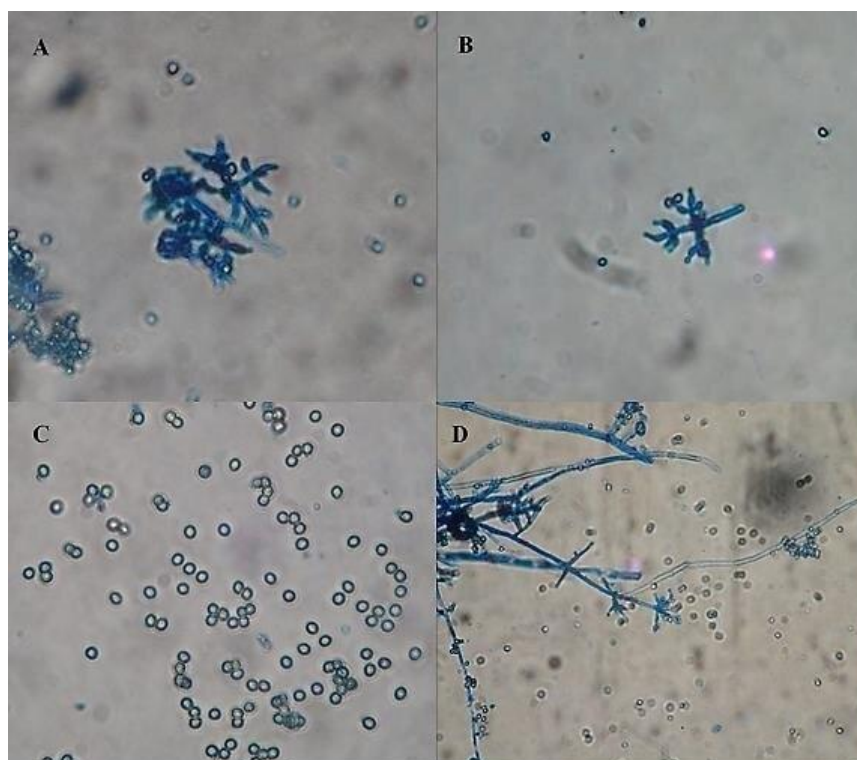
Домен	Еукаріоти
Царство	Гриби
Відділ	<i>Ascomycota</i>
Клас	<i>Sordariomycetes</i>
Порядок	<i>Hypocreales</i>
Родина	<i>Hypocreaceae</i>
Рід	<i>Trichoderma</i>

Конідії мають яйцеподібну форму, утворюються з голих клітин плодового тіла. Для конідієносців притаманне сильне галуження, вони септовані. Хламідіоспори формуються на міцеліальних структурах, що відзначаються грубою клітинною стінкою з великою товщиною, володіють стійкістю до умов довкілля.

*Trichoderma spp.* являє собою факультативний аеробний мікроорганізм (може жити при малих концентраціях вільного кисню, чи зовсім без нього). Гриб вільноживучий, здатний вступати в симбіотичну взаємодію з рослинами, позбавлений вірулентності. Внаслідок симбіозу підвищується ефективність колонізації ґрунтового середовища. Ключові типи покривів – сільськогосподарські, кислі, лісові ґрунти. Мікроорганізми поширені в широкому температурному діапазоні.

Мікроміцети локалізуються в субстратах, що містять різну кількість органічної речовини. Їх можна виділити з корневих структур, тому що вони знаходяться у верхньому прошарку (епідерміс), а також кілька шарів під ним. При

розповсюдженні *Trichoderma spp.* інтенсифікується ріст культур внаслідок синтезу представниками вторинних метаболітів. Зважаючи на можливості гриба,



він вважається гіпогейним та лігнолокультурним[6].

Рис. 1.2 Морфологія *Trichoderma spp.*. А і В – фіаліди; С – спори; D – конідієносці [7].

### 1.2.2. Культуральні ознаки

Колонії *Trichoderma spp.* відзначаються сірим, жовтим, чи зеленим кольором різних відтінків. Спостерігається поява концентричних кілець на середовищі, проте наведена характеристика притаманна не всім видам. Зазвичай поверхня чашки Петрі повністю вкрита колоніями мікроміцетів (суцільний газон) при відсутності дії на організм інгібуючих факторів. Колонії непрозорі, вони ватоподібні, чітко видно міцеліальні структури. Краї переважно рівні, але в деяких випадках – хвилясті. Колонії з'являються на поверхні поживного середовища вже на п'яту-сьому добу культивування. Залежно від числа спор змінюється інтенсивність забарвлення [8].

Адаптивні можливості *Trichoderma spp.* високі через що грибний агент розвивається при різних температурах та значеннях кислотності. Не зважаючи на це, температурний оптимум еквівалентний до значень, найбільш підходящих для росту інших мікроміцетів (25 °С). Ізоляти доцільно вирощувати на середовищі при показниках рН на рівні 5,5-7,5, тобто при нейтральній, слабкокислій і в певних ситуаціях слабколужній реакції. На противагу, оскільки рід включає велике число видів, існують штами, що розвиваються при високих температурах та екстремально низьких, чи високих значеннях рН [9].

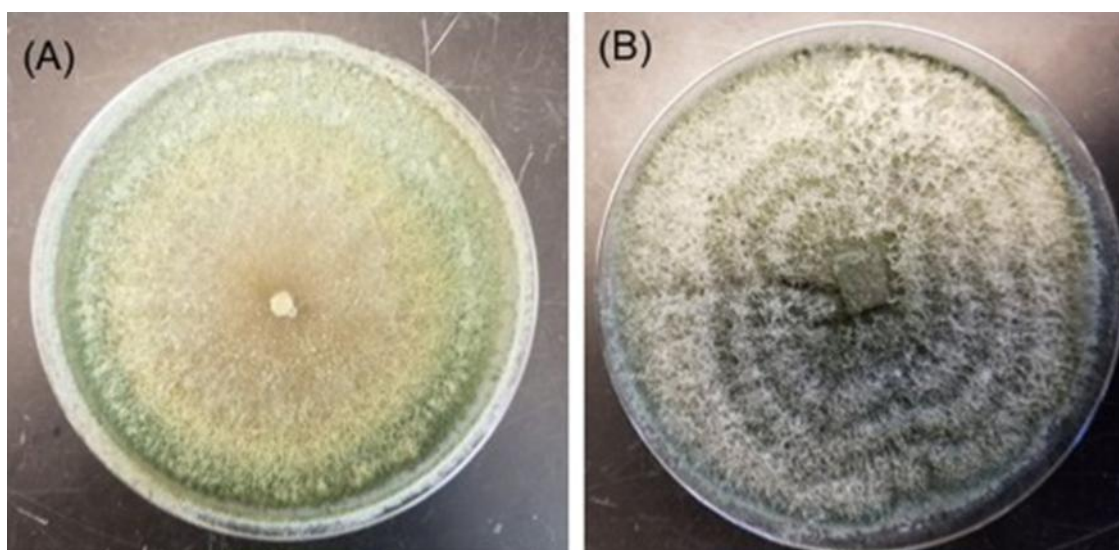


Рис. 1.3 *Trichoderma harzianum* (A) і *Trichoderma virens* (B) на поживному середовищі [10].

### **1.2.3. Сполуки, що синтезуються мікроміцетами роду *Trichoderma***

Хоча раніше було згадано про целюлозолітичні властивості представників *Trichoderma spp.*, дані гриби володіють протигрибковою, антимікробною, нематоцидною, антитрихомнадною, альгіцидною та навіть протипухлинною дією. До того ж, мікроміцети активізують ріст рослинних організмів внаслідок залучення різноманітних механізмів – переведення макроелементів у доступні для рослин форми, підвищення стійкості до біотичних та абіотичних стресів, синтез фітогормонів, що інтенсифікують розвиток кореневої системи, надземних структур рослин. Перед дослідження значення *Trichoderma spp.* в складі

біопрепаратів пропонується розглянути таблицю та визначити основні групи вторинних метаболітів та їх безпосередній вплив, який є важливим в галузі захисту рослин.

Таблиця 1.2

**Список вторинних метаболітів, які продукує *Trichoderma spp.* [11].**

<b>Сполука</b>	<b>Призначення</b>	<b>Продуцент</b>
Трихоцин	Протигрибковий	<i>Trichoderma harzianum</i>
Трихорзин	Протигрибковий	<i>Trichoderma virens</i>
6-пентил- $\alpha$ -пірон	Протигрибковий, антимікробний, регулятор росту	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma koningii</i>
6-пентил-2Н-піран-2-он	Протигрибковий, нематоцидний, регулятор росту томатів і <i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma atroviride</i> , <i>Trichoderma koningii</i>
Конінгінін А, В, Е	Протигрибковий, регулятор росту	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma koningii</i>
Конінгінін D	Протигрибковий, регулятор росту	<i>Trichoderma harzianum</i>
Конінгінін С	Протигрибковий, регулятор росту	<i>Trichoderma koningii</i>
3,4-дигідроксикаротин	Протигрибковий	<i>Trichoderma virens</i>
Лігнорен	Протигрибковий, антибактеріальний	<i>Trichoderma lignorum</i>

Триходермін	Протигрибковий, антитрихомонадний, мікотоксин	<i>Trichoderma virens, Trichoderma reesei, Trichoderma polysporum, Trichoderma sporulosum</i>
Мікотоксин Т2	Протигрибковий, мікотоксин	<i>Trichoderma lignorum</i>
Ергоконін А, В	Протигрибковий	<i>Trichoderma viride, Trichoderma koningii</i>
Вілідін	Антибіотик, інгібітор грибів, знищує спори, фітотоксин	<i>Trichoderma viride, Trichoderma virens, Trichoderma koningii</i>
Дермадін	Антимікробний	<i>Trichoderma viride, Trichoderma koningii</i>
Гліовірін	Антимікробний	<i>Trichoderma virens</i>
Емодін	Антимікробний, протипухлинний	<i>Trichoderma viride</i>
Вірон	Інгібітор фосфатидилінозитол- 3-кінази	<i>Trichoderma virens</i>
Індол-3-оцтова кислота	Регулятор росту	<i>Trichoderma virens, Trichoderma atroviride</i>
Індол-3- ацетальдегід	Ріст коренів	<i>Trichoderma virens, Trichoderma atroviride</i>
Індол-3- карбоксальдегід	Утворення додаткових коренів	<i>Trichoderma virens, Trichoderma atroviride</i>
Гліотоксин	Конкуренція за залізо в ризосфері	<i>Trichoderma viride, Trichoderma virens, Trichoderma hamatum</i>
Циклонеродіол	Протигрибковий	<i>Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii</i>

Триховірін II	Індукція стійкості огірків	<i>Trichoderma virens</i>
Аламетицин	Каналоутворюючий антибіотик, стійкість рослин	<i>Trichoderma viride</i>
Капроген В	Розчинення заліза недоступного для рослин	<i>Trichoderma spp.</i>
Гарціанова кислота	Антимікробний, регулятор росту рослин	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma arundinaceum</i>
β-мірцен	Регулює експресію генів (біотичні та абіотичні стреси)	<i>Trichoderma virens</i>
Абсцизова кислота	Регулює інтенсивність випаровування, газообмін	<i>Trichoderma virens</i> , <i>Trichoderma atroviride</i>
Цереброзид А, D	Антибактеріальний	<i>Trichoderma saturnisporum</i> , <i>Trichoderma spp.</i>
Трихокаротин Е, Н	Альгіцидний	<i>Trichoderma virens</i>
Нафуредін	Антибактеріальний, альгіцидний	<i>Trichoderma citrinoviride</i> , <i>Trichoderma spp.</i>
Хромон	Протигрибковий	<i>Trichoderma virens</i>
Трихокіндін I-VII	Біоіндуктор	<i>Trichoderma harzianum</i>
Тиросол	Протипухлинний	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma spirale</i>

Відповідно до табличних даних, мікроміцети *Trichoderma spp.* є продуцентами великого розмаїття вторинних метаболітів. Грибні агенти є перспективними не лише в контексті препаратів-деструкторів, а й можуть застосовуватись для захисту культур від фітопатогенів, індукувати ріст рослин, підвищувати стійкість до стресових факторів.

### **1.3. Біопрепарати для розкладання рослинних решток на основі *Trichoderma spp.* та механізм їх дії**

Біологічний метод захисту рослин є актуальним через тенденцію до відмови від агрохімікатів, як-от пестициди. Останні забруднюють водні джерела, ґрунти, завдають шкоди комахам, небезпечні для плодових дерев, кущів та деякої іншої рослинності. У людей пестициди спричиняють ураження ЦНС, виникнення проблем з дихальними шляхами, головний біль, розлади ШКТ, а в особливо тяжких випадках – кому. Порівняно з цим, мікробіологічні препарати є абсолютно безпечними та не наносять шкоди довкіллю, біорізноманіттю, здоров'ю людини.

Однією з груп біопрепаратів є деструктори, що спричиняють пришвидшення процесу розкладу рослинних решток у ґрунтах. Їх основною складовою є мікроорганізми та продукти їх життєдіяльності. Як відомо, ключову роль в препаратах-деструкторах відіграють грибні та бактеріальні ферменти, що руйнують лігноцелюлозних комплекс. Відповідно до механізму дії, відбувається результативне розщеплення залишків рослин та мінералізація органічної речовини.

Головними мікроорганізмами, які входять до складу біопрепаратів є гриби родів *Trichoderma* та *Aspergillus*, бактеріальні представники *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.* і актиноміцети. Спільною ознакою всіх наведених організмів є здатність до синтезу гідролітичних ферментів (целюлази, лігнінази, геміцелюлази), які розщеплюють рослинні полімери [12].

Біодеструктори є ефективним та екологічно безпечним рішенням для розкладання рослинних решток.

Препарат “Ефект Біо” містить бактерії *Bacillus spp.* та два види грибів роду *Trichoderma* (*Trichoderma lignorum*, *Trichoderma viride*). Мікроміцети продукують β-глюкозидази, целюлази та геміцелюлази, які відповідають за біодеградацію рослинних решток. Представники *Trichoderma spp.* перешкоджають росту та розвитку патогенних грибів не лише за допомогою синтезу вторинних метаболітів, а й шляхом конкурентної взаємодії з патогенами за джерело живлення. Окремою групою сполук, яку синтезують грибні агенти в складі біопрепарату є антибіотики. Триходермін, гліотоксин та вірідін є активними проти великої кількості фітопатогенів. Виходячи з цього, *Trichoderma lignorum* та *Trichoderma viride* унеможливають поширення хвороб між рослинними організмами.

Представники роду *Bacillus* є продуцентами гідролітичних ферментів, частина з яких є аналогічною до синтезованих сполук *Trichoderma spp.* (целюлази), а інша (амілази, протеази, ксиланази) слугує доповненням для ще результативнішої деструкції. Також бактеріальні агенти пригнічують розвиток патогенів родів *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Phytophthora* завдяки своїм антагоністичним властивостям, притаманним їм завдяки продукуванню поліпептидних антибіотичних речовин. *Bacillus spp.* як і *Trichoderma lignorum* забезпечує розвиток кореневої системи [13].

Препарат «Екостерн Триходерма» містить міцеліальні структури та спори грибів-антагоністів роду *Trichoderma* у розмірі  $1 \times 10^7$  КУО/см<sup>3</sup>. Окрім здатності до розкладання рослинних решток штами мікроміцетів підвищують ростову активність рослин, стимулюють стійкість до несприятливих умов, повторної появи хвороби, а також інгібують розвиток фітопатогенних мікроорганізмів. Біопрепарат знищує *Rhizoctonia spp.*, *Verticillium spp.*, *Fusarium spp.*, *Gibberella spp.*, *Helmiphthosporium spp.*, *Blumeria spp.*, *Alternaria spp.*, *Phytophthora spp.*, *Erysiphe spp.*, *Ascochyta spp.*, *Pyrenophora spp.*, *Septoria spp.* як на поверхні культур, так і у ґрунті. «Екостерн Триходерма» використовують для

передпосівної обробки насіння, в засіб занурюють корені розсади та саджанців [14].

«Деструктор МБК» містить два види грибних агентів – *Trichoderma viride* та *Trichoderma virens*. Призначення біопрепарату аналогічне до мети застосування всіх деструкторів – утилізація рослинних решток шляхом обробки ґрунтового середовища. До того ж, засіб покращує розвиток автохтонних асоціацій мікроорганізмів, підвищує родючість покривів, інгібує ріст фітопатогенів. При використанні «Деструктора МБК» відносно соняшника в разі його ураження склеротиніозом (біла гниль) урожайність культури підвищується на 10-20%.

Рослинні рештки містять певний відсоток фосфору, азоту та калію, проте дані елементи стануть доступними для рослин тільки через 3-4 роки опісля природного розщеплення органічної речовини. Окрім цього, вони можуть бути джерелом живлення для фітопатогенів. При збагаченні середовища біопрепаратом макро- та мікроелементи переводяться у доступну для культур форму за значно менший проміжок часу. Структура ґрунту в контексті його загальних фізико-хімічних властивостей покращується, частка гумінових речовин підвищується. За вмістом органічних сполук одна тонна рослинних решток еквівалентна 3-4 тоннам гною. Додаткове внесення азотних добрив знижує терміни деструкції сегментів культур. Препарат не виявляє токсичності відносно тварин, людей та комах [15].

Препарат «Полько Деструктор» містить *Trichoderma viride*, *Bacillus subtilis* (окрім целюлаз продукує протеолітичні ферменти, знищує патогенні форми грибів та бактерій), *Bacillus megaterium* (бере участь в інтенсифікації фосфатного обміну, активізує ріст рослинних організмів за допомогою покращення засвоюваності поживних елементів), *Bacillus licheniformis* (синтезує антибіотичні сполуки для пригнічення фітопатогенів, бере участь в деструкції целюлози), *Azotobacter croococcum* (фіксує атмосферний азот, постачає його рослинам в асимільованій формі), *Bradyrhizobium japonicum* (аналогічно до попереднього

мікроорганізму насичує культури азотом, але в основному його дія спрямована на бобові).

Під дією біопрепарату відбувається нарощування відсотка фульвокислот і гумінових кислот в родючому шарі ґрунту. Деградація органічних речовин закінчується утворенням гумусу, який збагачує родючий шар. Окрім цього, зв'язування поживних речовин з формуванням стійких комплексів унеможлиблює їх втрати у вигляді вилуговування. Відбувається оптимізація рівня ґрунтової вологості, стабілізація кислотності, покращення доступу повітря та відповідно загальної структури покриву. Мікроорганізми, що входять до складу комплексу не лише знищують фітопатогени, а і їх спори, які розташовуються у ґрунті. Препарат може застосовуватись в широкому діапазоні температур (5-35 °С). Рекомендоване співвідношення вуглецю та азоту становить менше, ніж 1:25, доцільним є попереднє подрібнення решток рослин [16].

Мікробіологічний засіб «Дестерн» складається з двох штамів *Trichoderma viride*, чотирьох штамів *Trichoderma harzianum*, включає *Trichoderma lignorum*, *Bacillus megaterium*. Біопрепарат також містить цілих шість штамів *Bacillus circulans*, які беруть участь в целюлолізі за рахунок продукування целюлаз та деструкції лігноцелюлозного комплексу з утворенням олігосахаридів. Варто зазначити, що вторинні метаболіти мікроміцетів та бактерій розчиняють важкодоступні ґрунтові поліфосфати. Препарат є ефективним проти корневих гнилей рослинних організмів та фузаріозу.

На відміну від «Полько Деструктор» цей засіб можна застосовувати при ще більш низьким температурах (від 3 °С), тому фактично він є дієвим більшу частину року. Деструкція органічної речовини відбувається навіть без додаткового внесення азотних, чи інших добрив. Насиченість ґрунту поживними елементами активізує діяльність місцевих асоціацій мікроорганізмів. Доцільною кислотністю для використання препарату є проміжок від 6 до 7,5 [17].

## 1.4. Проблеми та перспективи застосування препаратів на основі мікроорганізмів роду *Trichoderma*

### 1.4.1. Проблеми

Першою перешкодою при використанні біопрепаратів, що включають *Trichoderma spp.* є несприятливі умови середовища. Оскільки деструктори необхідно вносити при температурах 3-35 °С, то при заморозках пізньою осінню та ранньою весною, а також за високих температур влітку вони не є дієвими. Однією з умов застосування препаратів є відносно вузький діапазон рН ґрунту. Спираючись на це, сильно кислі, чи лужні середовища є непридатними для підтримання життєздатності та активності ферментативних систем представників роду *Trichoderma* [17].

Не зважаючи на те, що мікроміцети здатні до конкурентної взаємодії з певним колом патогенних мікроорганізмів, існують гриби і бактерії, що пригнічують *Trichoderma spp.* Таким чином, введення екзогенних штамів не завжди є ефективним, тому що залишається ймовірність знищення грибів місцевими асоціаціями. В разі, якщо вплив автохтонних консорціумів на види *Trichoderma* не є згубним все ж відбувається зниження виробітку вторинних метаболітів, чи зниження їх активності [13].

Ключові показники, що мають безпосередній вплив на деструктивну здатність та ефективність процесу – це тип ґрунту, його дренаж та вологість. У глинистих типах де дренаж є достатньо поганим, а кількість доступного кисню обмежена спостерігається зниження результативності біодеградаційних процесів. При низькій частці доступної води зменшується надходження поживних речовин та їх транспорт, що спричиняє неналежну роботу ферментативних систем, продукцію невеликого числа ферментів, які приймають участь в розкладанні субстрату [18,19].

Спираючись на те, що до складу біопрепаратів входять живі клітини та спори мікроорганізмів, недоцільні умови зберігання та вплив стресових

факторів, тобто надвисокої вологості, солоності, УФ-випромінювання, різких змін температури або високих, чи низьких значень призводить до зниження ефективності суспензійних форм засобів, а в гіршому випадку – до загибелі мікроміцетів роду *Trichoderma* [20].

Застосування хімічних засобів захисту рослин має фатальний ефект для грибних агентів. Першою проблемою є спроба одночасного використання агрохімікатів та біопрепаратів, оскільки компоненти перших відзначаються негативною дією на клітини та спори *Trichoderma spp.*. Іншою перешкодою є довгий строк збереження пестицидів у середовищі. Хлорорганічні види характеризуються здатністю акумулюватись в ґрунті, тому постійна і довготривала обробка культур пестицидами виключає можливість переходу на органічне землеробство [21].

Аналогічно до видового різноманіття представників *Trichoderma spp.* існує відмінність між штамами одного виду, яка обумовлена генетично. Таким чином, ефективність деструкції целюлози та пригнічення патогенних форм мікроорганізмів є неоднаковим в межах одного виду. Переважна більшість біопрепаратів створені на основі штамів, які виділені та протестовані в лабораторних умовах. Натомість, неефективна дія може бути наслідком відсутності тестування біопрепаратів у природному середовищі [22].

Підбиваючи підсумки, основними проблемами під час застосування препаратів-деструкторів на основі *Trichoderma spp.* виступають залежність від умов довкілля, вплив стресових факторів, використання пестицидів, пригнічення мікроміцетів місцевими мікроорганізмами, генетичні відмінності штамів у межах виду та відсутність тестування засобів у природі.

#### ***1.4.2. Перспективи***

Зважаючи на варіабельність мікроміцетів роду *Trichoderma* актуальною є генетична оптимізація з метою отримання ідентичних представників створених в лабораторних умовах. Задля покращення проходження процесу целюлолізу та

ефективнішого пригнічення фітопатогенів пропонується впроваджувати методи генетичної інженерії та редагування геному. Внаслідок застосування цих методик будуть отримані ізоляти зі здатністю до результативнішої деструкції органічної речовини та боротьби зі сторонніми, грибами, бактеріями. Окрім цього, подальше використання полікомпонентних препаратів, які базуються на штаммах, що ефективно розкладають складові лігноцелюлозного комплексу, активізують імунну відповідь, покращують живлення рослин за допомогою посилення ферментативної активності є перспективним підходом [16,23].

Оскільки штами *Trichoderma spp.* володіють сприйнятливістю до умов довкілля, а біопрепарати на їх основі зазвичай зустрічаються лише у вигляді суспензій, пропонується залучити інкапсуляцію або випуск більш нових форм з метою підвищення стійкості мікроміцетів до змін температури, вологості, кислотності та солоності середовища. Введення змін до процесу культивування з метою збільшення виходу біомаси сприятиме зниженню ціни та більшій зацікавленості у використанні біопрепаратів, порівняно з хімічними пестицидами [24,25].

Перспективний є підвищення числа біопрепаратів, які включають не тільки грибних агентів *Trichoderma spp.*, а й інших представників бактерій, мікроміцетів. Певна частка подібних засобів уже фіксується на ринку. Синергетична взаємодія з азотфіксуючими мікроорганізмами (*Bradyrhizobium spp.*, *Azotobacter spp.*), видами, що переводять фосфати у доступну форму (*Bacillus megaterium*) відкриє шлях до розширення спектру дії та застосування препаратів на основі *Trichoderma spp.* не лише в контексті деструктора рослинних решток [16].

Не зважаючи на те, що дія вторинних метаболітів представників роду *Trichoderma* спрямована не тільки на розклад органічних решток, покращення фітосанітарного стану ґрунту, пригнічення фітопатогенів, інтенсифікацію росту та розвитку рослинних організмів, іншим застосуванням мікроміцетів надають доволі мало уваги. Окрім перелічених ефектів, гриби мають нематоцидне, альгіцидне та навіть антивірусне застосування. За умови вивчення менш відомих

та поширених видів *Trichoderma spp.* відкриється шлях до можливості більш широкого використання біопрепаратів [11].

Кліматичні зміни в природному середовищі потребують внесення стійких видів грибів. Аномально жарке літо, посуха в ґрунтовому середовищі та почастищення розвитку ерозій покривів максимально негативно впливають на розвиток грибів та можливість їхньої колонізації середовища. Створення мікроорганізмів, що мешкають не тільки в стандартному діапазоні показників, а й підвищення кількості штамів, які зберігають життєздатність при негативних значеннях, чи надвисоких температурах, високому відсотку солей, різноманітній вологості та рН є оптимальним для можливості їх поширення в різних кліматичних умовах середовищах з низьким вологовмістом, засоленістю та різним рівнем кислотності. Як відомо, деякі види *Trichoderma spp.* є альгіцидами, але за умови застосування штамів, що не пригнічують розвиток мікроскопічних водоростей доцільно використовувати останніх для синергізму. Комплекс з мікроміцетів та представників *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis* сприятиме покращенню аерації та підвищенню кількості поживних речовин у ґрунтовому середовищі [26].

Отже, перспективами є використання генно-інженерних підходів та системи редагування геному, створення біопрепаратів, які містять різні види мікроміцетів або комплекс грибів та бактерій, оптимізація культивування, розширення сфери використання, підвищення стійкості існуючих видів, поліпшення умов зберігання.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

### 2.1 Виділення мікроміцетів роду *Trichoderma*

#### 2.1.1. Поживне середовище Чапека

Для виділення та культивування *Trichoderma spp.* з ґрунту було обрано метод висіву ґрунтової суспензії, а в якості середовища для культивування - поживне середовище Чапека.

Для культивування будь-яких мікроорганізмів у лабораторії необхідні поживні середовища, які, в свою чергу, повинні відповідати таким вимогам:

- Бути поживними, тобто задовольняти мікроорганізми всім необхідним для їх життєдіяльності.
- Мати оптимальне кислотно-лужне середовище.
- Бути стерильним, щоб уникнути сторонньої контамінації культури.
- Мати певний окисно-відновний потенціал, який залежить від того чи мікроорганізми анаероби або аероби.
- Мати буферну систему, щоб нейтралізувати сторонні продукти метаболізму.
- Бути прозорими. Хоч це і не обов'язково, проте полегшує підрахунок колоній.

Середовище Чапека, або як його ще називають Чапека-Докса, це тверде, напівсинтетичне поживне середовище для культивування мікроміцетів та деяких видів бактерій, у якому нітрат натрію виконує функцію єдиного джерела неорганічного азоту [27].

Власне через особливість, наведену вище, середовище Чапека є селективним, адже відсутність органічних азотовмісних сполук пригнічує ріст бактерій, та створює оптимальні умови для росту та розвитку цвілевих грибів, і є доцільним для використання в даному дослідженні.

Джерелом вуглецю є виключно глюкоза, яка також виконує функцію енергетичного субстрату.

Таблиця 2.1

## Склад середовища Чапека [28].

Компоненти	Концентрація, г/л
$K_2HPO_4$	1
$FeSO_4$	0,01
$NaNO_3$	3
Глюкоза	30
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,5
KCl	0,5
Агар-агар	18

Щоб приготувати середовище необхідно зважити всі сполуки на вагах, обережно перенести в колби та додати 1 л дистильованої води. Отриману суміш ретельно перемішують, нагрівають та доводять до повного розчинення компонентів. Для досягнення найоптимальніших показників росту та розвитку культури важливо стабілізувати кислотно-лужний баланс до 4.5–5.5. Стерилізацію проводять в автоклаві, під дією вологого жару при температурі 121°C та тиском 1 атм протягом 15 хвилин. Чашки Петрі попередньо стерилізуємо сухим жаром 1 годину при температурі 170°C і розливаємо середовище так, щоб об'єм займав приблизно одну третину посудини.



Рис 2.1 Приготування середовища Чапека для висіву ґрунтової суспензії

\*Джерело: фото автора



Рис 2.2 Розлив поживного середовища в чашки Петрі.

\*Джерело: фото автора

### **2.1.2. Вибір ґрунтових зразків**

Відомо, що представники роду *Trichoderma* живуть і розвиваються в ґрунтах, на корі дерев, при наявності високого вмісту вологи. Виділення мікроміцетів з ґрунту є більш доцільним порівняно з виділенням з деревини через ряд причин:

- Природна ніша аксомікотових грибів – ґрунт, на деревах вони розвиваються здебільшого через вторинне заселення.

- В ґрунті *Trichoderma spp.* через високу конкуренцію з іншими мікроорганізмами виробляє більше ферментів, що сприяє відбору більш агресивних та біологічно активних штамів.
- На деревині умови розвитку гриба більш пригнічені – повільний обмін речовин, в залежності від стану дерева, нижча вологість та низький вміст доступних поживних речовин.
- Метод виділення мікроорганізмів з ґрунту значно легший ніж з деревини, і не потребує додаткового обладнання.

Відбір ґрунтових зразків проводили на орній ділянці площею 100 м<sup>2</sup>. Для цього вибрали три точки, у кожній з яких спочатку знімали верхній шар ґрунту товщиною приблизно 2 см. Потім стерильним шпателем відбирали невелику кількість ґрунту з нижнього шару. Проби поміщали в чисті скляні банки з корковими пробками. Усі взяті зразки змішували в одній банці для отримання об'єднаного зразка, який більш точно відображає стан ґрунту на всій ділянці.

Використані шпатель після кожного відбору очищали та занурювали в дезінфікуючий розчин — 70% етиловий спирт — щоб уникнути забруднення зразків.

Перед аналізом із ґрунту видаляли сторонні домішки, такі як коріння рослин та інші органічні або неорганічні включення. Хоча іноді зразки можуть зберігати в холодильнику до двох діб, для точності досліджень аналіз виконували в день відбору.

### ***2.1.3 Приготування ґрунтової суспензії***

Наступним етапом даної роботи було приготування ґрунтової суспензії. Для цього з ґрунтової проби відбирали 10 г ґрунту, обережно розтирали та переносили в стерильну, конічну колбу об'ємом 250 мл з 90 мл дистильованої води. Суміш інтенсивно перемішували та відстоювали для отримання суспензії.

Далі проводили серію послідовних розведень з метою виділення об'єкта дослідження.

Перше розведення (1:10) готували з 10 ґрунту якого додавали в 90 мл води, як зазначено на початку. Для отримання наступного розведення стерильно переносили самплером 1 мл першого розведення в другу колбу, яка також містила 90 мл стерильної води, отримуючи розведення 1:100. З другого розведення готували третє, а з третього-четверте [29].

В загальному, для ідентифікації об'єкта даним методом достатньо три або чотири розведення, проте з метою виділення *Trichoderma spp.* було приготовано більше.

Найголовніше в даному методі це точність та стерильність — для мінімальної контамінації зразків та достовірності результатів.



Рис 2.3 Приготування послідовних (серійних) розведень.

\*Джерело: фото автора

#### ***2.1.4. Посів на середовище***

Зважаючи на те, що в роботі використовували тверде поживне середовище, був обраний метод поверхневого посіву. Для цього обережно відкривали чашки Петрі лівою рукою та тримали в нахиленому положенні. На поверхню попередньо розлитого середовища, біля полум'я спиртівки з метою збереження асептичних умов додавали 1 мл розведення і рівномірно розподіляли шпателем Дригальського по всі поверхні агару. Після і перед посіву шпатель фламбували з метою дотримання стерильності. Таким чином проводився посів кожного з розведень. З одного розведення отримали 3 чашки.

Після посіву суспензії на всі чашки їх переносили в термостат (25 °C) для підтримання температури оптимальної для росту мікроорганізмів.

Для лабораторних досліджень метод поверхневого посіву має ряд переваг, а саме:

- Візуальний контроль культури та її морфології.
- Можливість виділення чистої культури для подальших досліджень.
- При поверхневому посіві значно кращий доступ кисню, порівняно з глибинним методом, який пригнічує аерацію, що є дуже важливим фактором, враховуючи, що об'єкт даної роботи – аероб.
- Поверхневий метод дозволяє краще оцінити можливу контамінацію.

## 2.2 Ідентифікація *Trichoderma spp.*

### 2.2.1 Мікроскопія

Основу методів дослідження будь-яких мікроорганізмів становить мікроскопія, яка в свою чергу поділяється на світлову та електронну.

Що робота світлової, що електронної мікроскопії ґрунтується на принципі дифракції, відбитті або заломленні електромагнітних хвиль, які взаємодіють зі зразком. Отримане розсіяне зображення фіксується з метою його формування.

Загалом, практично для всіх лабораторних досліджень використовують саме світлові мікроскопи через такі причини:

- Простота у використанні та економічна доступність порівняно з електронними мікроскопами.
- Достатній рівень збільшення для багатьох задач.
- Дозволяють спостерігати за живими організмами в реальному часі.

Світлова мікроскопія, в свою чергу, поділяється на фазово-контрастну, люмінісцентну, темнопольну, світлопольну та інверсійну.

Фазово-контрастна мікроскопія — це метод, в основу якого взято відмінності в показниках заломлення об'єкта дослідження та навколишнього середовища. Через ці відмінності змінюється швидкість поширення світла: у зонах з вищим показником заломлення світловий промінь проходить повільніше, що створює ефект «затримки» — фазового зсуву. Це призводить до змін у яскравості зображення, що сприймається як варіація контрасту. У результаті фазові зсуви перетворюються на коливання світла з різною амплітудою.

Люмінісцентна мікроскопія - метод, заснований, як зрозуміло з назви, на явищі люмінісценції – здатності об'єкта «світитися», що обумовлено його здатністю поглинати світлову енергію. Люмінесценція зумовлюється дією ультрафіолетового, синього або фіолетового випромінювання. Деякі клітинні компоненти та сполуки володіють власною (внутрішньою) флуоресценцією — зокрема, хлорофіл, вітаміни А і В<sub>1</sub>, а також певні пігменти. Водночас багато клітинних структур зазвичай не здатні до самостійного світіння, однак набувають флуоресцентних властивостей після обробки спеціальними люмінесцентними барвниками. До таких речовин належать флуоресцеїн, акридин оранжевий, берберин-сульфат, флоксин та інші барвники, які використовуються для специфічного забарвлення і виявлення окремих компонентів клітини [30].

Темнопольна мікроскопія базується на методі на явищі розсіювання світла на межі середовищ з різними показниками заломлення. Для реалізації цього методу застосовується спеціальний конденсор темного поля, який може бути

встановлений як у звичайному, так і в темнопольному мікроскопі. Під час роботи в темному полі основний світловий пучок не освітлює об'єкт безпосередньо — на нього спрямовуються лише периферійні промені. У результаті цього фон залишається темним, а об'єкт, що розсіює світло, виглядає яскравим на темному тлі [31].

Імерсійна мікроскопія — це метод мікроскопічного аналізу, при якому між об'єктивом мікроскопа і препаратом наноситься спеціальна імерсійна рідина, в яку занурюється об'єктив. Оскільки повітря і скло мають різні показники заломлення, світлові промені, проходячи через ці середовища, зазнають заломлення та розсіювання, що призводить до спотворення зображення. Імерсійна рідина має показник заломлення, подібний до скла, що дозволяє зменшити втрати світла та оптичні викривлення. Завдяки цьому значно підвищується чіткість зображення і покращується роздільна здатність мікроскопа.

Світлопольна мікроскопія також відома як метод світлого поля, використовується для дослідження забарвлених клітин і тканин з використанням світла у видимому спектрі. Формування зображення відбувається за рахунок відмінностей у здатності різних ділянок об'єкта поглинати світло. Коли світловий промінь проходить через забарвлений зразок, інтенсивність світла змінюється, що створює контраст, який добре сприймається людським оком [32].

Для даного дослідження використовували світлопольний мікроскоп через забарвленість клітин досліджуваного об'єкта та легкість і швидкість у використанні.



Рис. 2.4 Будова світлопольного мікроскопа [33]

### 2.2.2. Приготування препаратів для мікроскопії

Методика приготування препарату залежить від мети дослідження. Якщо нам необхідно дослідити живий об'єкт – використовують метод «відбиток», «висячої» або «роздавленої» краплі, якщо ж задача дослідити об'єкт в неживому стані – готують фіксований препарат.

Для даного дослідження було обрано метод «відбиток» через його зручність для вивчення морфології грибів, їх споросців та спор, та просторового дослідження розташування клітин.

Щоб приготувати препарат необхідно з поживного середовища, на якому суцільним шаром або колоніями вирости мікроміцети, вирізати невеликий блок. Його обережно переносять на предметне скельце таким чином, щоб поверхня з мікроорганізмами була зверху. Потім до цієї поверхні обережно прикладають покривне скельце, злегка притискаючи, і знімають так, щоб не було зміщення вбік, з метою збереження структури відбитку. Отриманий відбиток занурюють вниз у краплю води або розчину метиленового синього на чистому предметному склі, після чого препарат готовий до мікроскопічного дослідження об'єкта [34].

Так як працювали зі світлопольним мікроскопом було вирішено користуватися барвником для підвищення контрастності мікроміцетів.

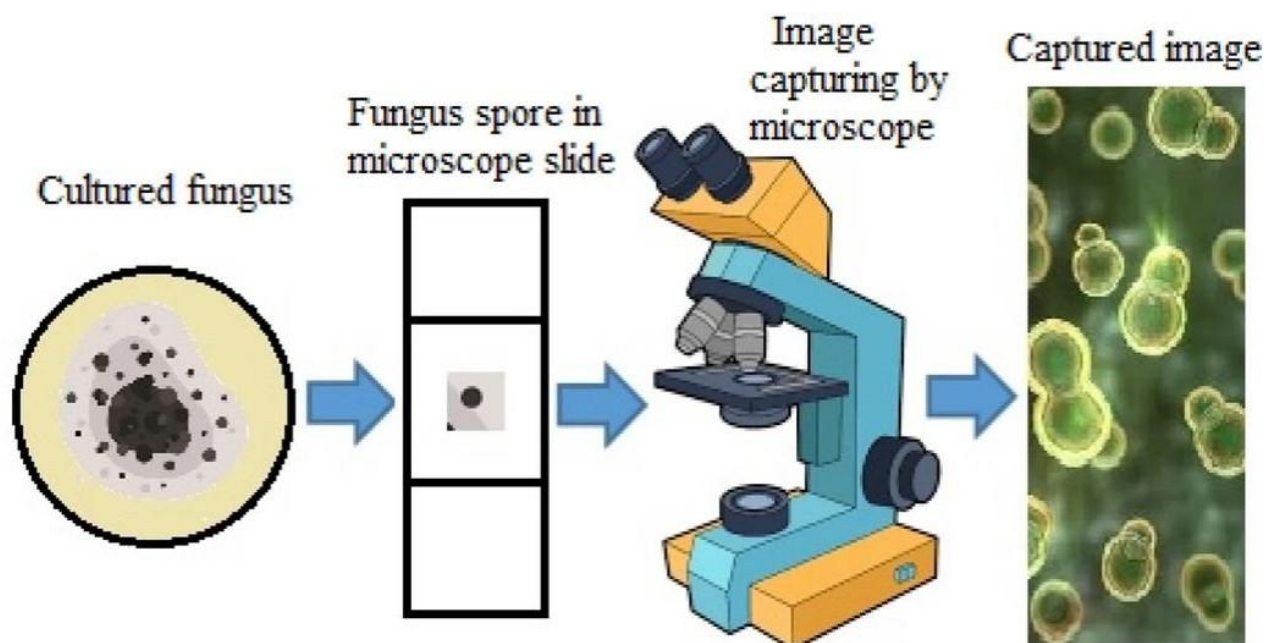


Рис. 2.5 Схема дослідження будови мікроміцетів мікроскопією [35]

## 2.3 Визначення ферментативної активності

### 2.3.1 Культивування *Trichoderma* та індукція синтезу ферментів

Для визначення здатності мікроміцетів синтезувати ферменти, що руйнують лігноцелюлозний комплекс, попередньо виділені методом змиву фрагментів гіфу та конідій з середовища, гриби культивували в пробірках рідкого модифікованого Чапека-Докса, де єдиним джерелом вуглецю був фільтрувальний папір (Фільтрак) масою 8 гр. Таким чином ми змушуємо мікроорганізм розкласти целюлозу, через відсутність будь-яких інших джерел енергії [36].

Таблиця 2.2

#### Склад модифікованого середовища

Компоненти	Концентрація, г/л
$K_2HPO_4$	1

FeSO <sub>4</sub>	0,01
NaNO <sub>3</sub>	3
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,5
KCl	0,5
Фільтрувальний папір	8

Після, з метою отримання супернатанту (культуральної рідини), спорово-міцеліальну суспензію центрифугували 25 хв при 10000 об/хв та фільтрували через скляний фільтр для відділення залишків целюлозовмісного субстрату, які в подальшому висушувалися та використовувалися для розрахунку ступеня деструкції за формулою:

$$A = \left(1 - \frac{A_0 - A_1}{A_0}\right) \cdot 100 \quad (2.1)$$

де,  $A_1$  – кінцева маса субстрату;

$A_0$  – початкова маса субстрату.

Целюлозлітичну активність вимірювали протягом 3 тижнів з інтервалом в чотири дні протягом всього часу культивування.

### **2.3.2 Біохімічні тести**

Для визначення загальної целюлазної активності відбирали 1 мл супернатанту, 0,05 М натрій-цитратного буфера і додавали до 50 мг фільтрувального паперу та інкубували при 40°C протягом 1 години. За одиницю загальної целюлазної активності вважали кількість ферменту, здатну за одну годину утворити 1 мг редукуючих цукрів [37].

Ендоглюканазну активність визначали шляхом дії ферменту на 0,5% розчин натрієвої солі карбоксиметилцелюлози (Na-КМК), приготовлений у 0,05 М натрій-цитратному буфері. До 1 мл субстратного розчину додавали 1 мл культурального фільтрату й інкубували при 40 °С протягом 30 хвилин. Одиниця

ендоглюканазної активності відповідала кількості ферменту, що утворює 1 мг редукуючих цукрів за півгодини [36, 37].

Екзоглюканазну активність оцінювали з використанням мікрокристалічної целюлози (Авіцел, «Евалар»). Для аналізу до 50 мг субстрату додавали по 1 мл культуральної рідини та 1 мл 0,05 М натрій-цитратного буфера. Інкубація тривала 60 хвилин при температурі 40 °С [36].

Для оцінки  $\beta$ -глюкозидазної (целобіазної) активності як субстрат використовували 0,025% розчин целобіози («Merck») у 0,05 М натрій-цитратному буфері. До 1 мл цього розчину додавали 1 мл культурального фільтрату та інкубували при 40 °С протягом 30 хвилин.

Кількість редукуючих цукрів визначали за методом Шомоді–Нельсона. Для цього до 2 мл реакційної суміші додавали 1 мл реактиву Шомоді, після чого інкубували 15 хв при температурі 100 °С. Після швидкого охолодження на льодяній бані вносили 1 мл реактиву Нельсона і доводили загальний об'єм розчину дистильованою водою до 25 мл. Суміш ретельно перемішували. Як контроль використовували зразки, в яких замість культуральної рідини додавали 1 мл поживного середовища [36, 37].

Оптичну густину розчинів вимірювали на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 560 нм.

Для позначення активності окремих целюлозолітичних ферментів використовували міжнародні одиниці (IU), що відповідають тій кількості ферменту, яка необхідна для каталізу утворення 1 мкмоль редукуючих цукрів за 1 хв інкубації, а у випадку з  $\beta$ -глюкозидазою – утворення глюкози. Калібрувальну криву будували за стандартними розчинами глюкози.

Статистичну обробку даних здійснювали завдяки програмному забезпеченню Microsoft 10 та Excel.

### РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Мікроміцети інкубували при 25°C протягом 7 днів, після закінчення інкубаційного періоду проводили морфологічно-культуральну характеристику та ідентифікацію мікроскопією.

Колонії, отримані методом ґрунтових серійних розведень на середовищі Чапека, розвивалися швидко, мали округлу форму з чітко окресленими краями. Колір колоній змінювався з часом: на ранніх етапах культура мала білувато-кремове або сірувато-біле забарвлення, яке поступово набувало характерного зеленого, оливково-зеленого або жовто-зеленого кольору внаслідок інтенсивного формування конидій. В окремих випадках було виявлено нерівномірне забарвлення, що може свідчити про метаболітичну активність або наявність сторонньої мікрофлори.

Зворотний бік колоній мав блідо-жовтуватий або сіруватий відтінок, без вираженої пігментації середовища.

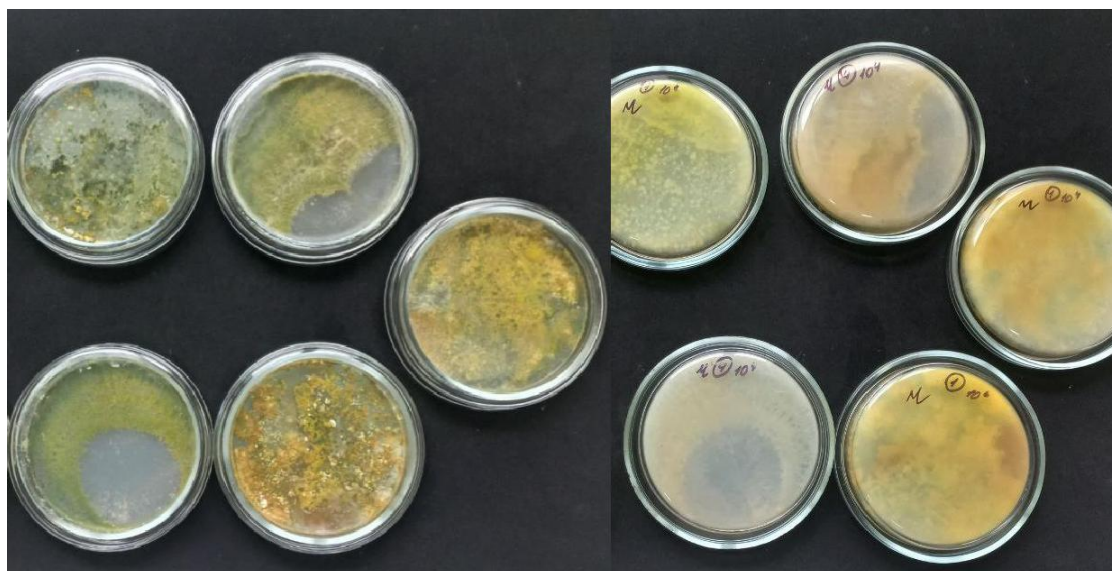


Рис 3.1 Колонії мікроміцетів роду *Trichoderma*.

\*Джерело: фото автора

Мікроскопічне дослідження підтвердило наявність типових для *Trichoderma* структур. Вегетативні гіфи прозорі (гіалінові), септовані, із частими розгалуженнями. Конідієносці розгалужені в кілька ярусів (у вигляді неправильної «щітки»). Конідії розміщені в ланцюжках, еліпсоїдні або майже округлі, з гладкою або слабо шорсткуватою поверхнею.

Після дослідження міцеліальної структури виділених ізолятів мікроскопією було висунуто припущення, що досліджуваний об'єкт це *Trichoderma spp.*, отже приступили до наступного етапу даної роботи – визначення ферментативної активності. Для цього було виділено 5 ізолятів по одному з кожної чашки Петрі та культивували на середовищі, в яке помістили фільтрувальний папір і обраховували ступінь деструкції за формулою, наведеною в 2 розділі.

Таблиця 3.1

### Целюлозолітична активність ізолятів

Досліджуваний об'єкт	Відсоток деструкції фільтрувального паперу, %
----------------------	--

Контроль, без мікроміцетів	12
<i>Trichoderma sp. 1</i>	27
<i>Trichoderma sp. 2</i>	30
<i>Trichoderma sp. 3</i>	46
<i>Trichoderma sp. 4</i>	24
<i>Trichoderma sp. 5</i>	39

З наведених результатів можна зробити деякі висновки: найбільший ступінь деструкції має 3 ізолят, найменший – 4. Якщо порівнювати з контролем, то об'єкт дослідження проявляє достатньо непогану целюлозолітичну активність і є підтвердженням властивостей *Trichoderma spp.* до руйнування лігноцелюлозного комплексу.

З огляду на те, що мікроміцети проявили ознаки ферментативної активності щодо деструкції целюлози, ми переходимо до останніх етапів роботи, а саме біохімічних тестів на екзоглюканазну, ендоглюканазну, загальну целюлазну та  $\beta$ -глюкозидазну (целобіазну) активності.

Екзоглюканазу досліджували, адже її синтез мікроорганізмами свідчить про їх рівень целюлозолітичного потенціалу [38].

Згідно з наведеним графіком (Рис. 3.1) ми можемо стверджувати, що найбільшу екзоглюканазну активність ізоляти проявили на 18 день культивування, тобто на 3 тижні, і складала для *Trichoderma sp. 1* – 0,075 IU/ml, *Trichoderma sp. 2* – 0,120 IU/ml, *Trichoderma sp. 3* – 0,240 IU/ml, *Trichoderma sp. 4* – 0,058 IU/ml, *Trichoderma sp. 5* – 0,175 IU/ml.

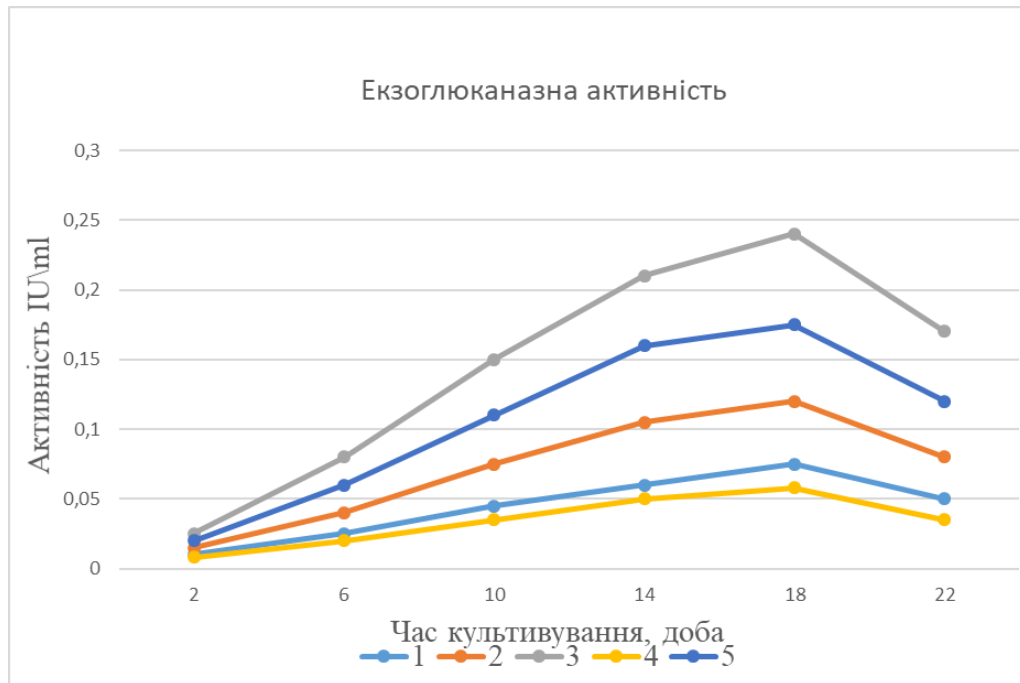


Рис. 3.1 Екзоглюканазна активність мікроміцетів.

\*Джерело: сформовано автором

Фермент ендоглюканаза каталізує розщеплення аморфних форм целюлози, тим самим утворюючи целобіозу [39]. Як і в попередніх дослідженнях, субстратом був фільтрувальний папір. Найвищу ендоглюканазну активність виявили на 14 день і, власне, показники становили для *Trichoderma sp. 1* – 0,193 IU/ml, *Trichoderma sp. 2* – 0,295 IU/ml, *Trichoderma sp. 3* – 0,450 IU/ml, *Trichoderma sp. 4* – 0,160 IU/ml, *Trichoderma sp. 5* – 0,325 IU/ml.

Якщо говорити про наведені вище ферменти, можна зробити висновки, щодо їх активності. Найбільшу і екзо- і ендоглюканазну активність мав 3 ізолят, найменшу ж 4. Ендоглюканазна активність проявила себе сильніше, ніж екзо- у всіх об'єктах.

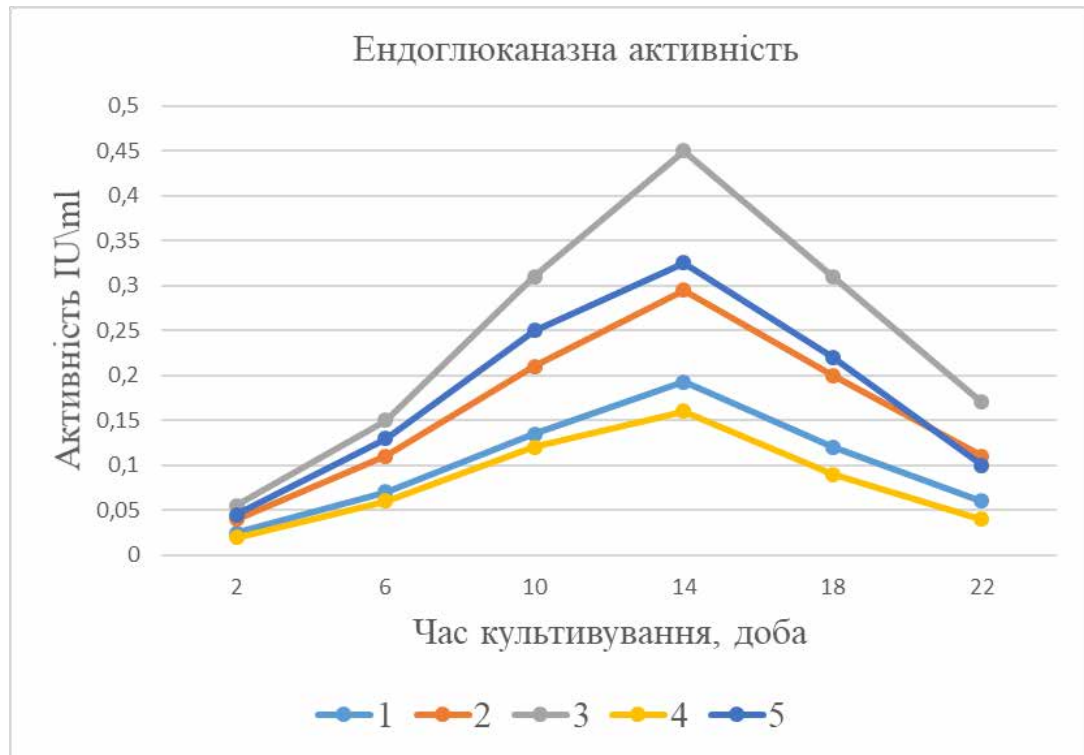


Рис. 3.2 Ендоглюканазна активність ізолятів.

\*Джерело: сформовано автором

Ендоглюканази і екзоглюканази приймають участь в першому етапі розщеплення целюлози, одним із продуктів якого є утворення целобіози та в подальшому її гідроліз до глюкози  $\beta$ -глюкозидазою [40]. Саме з цієї причини необхідно дослідити даний фермент.

Максимум  $\beta$ -глюкозидазної активності спостерігали на 18 день культивування, з використанням фільтрувального паперу як джерела вуглецю і отримали такі показники: для *Trichoderma sp. 1* – 0,085 IU/ml, *Trichoderma sp. 2* – 0,100 IU/ml, *Trichoderma sp. 3* – 0,210 IU/ml, *Trichoderma sp.* – 0,060 IU/ml, *Trichoderma sp. 5* – 0,130 IU/ml.

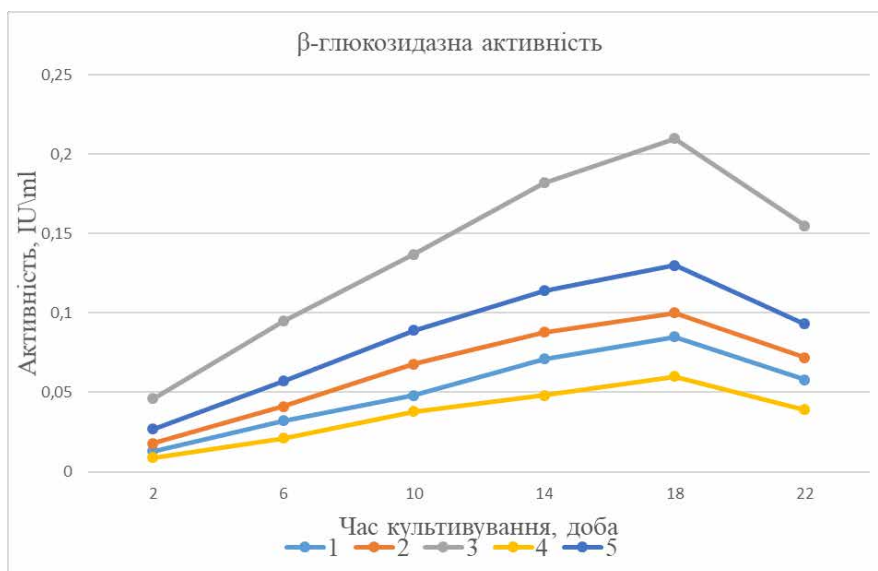


Рис. 3.3 β-глюкозидазна активність *Trichoderma sp.* 1, 2, 3, 4, 5.

\*Джерело: сформовано автором

Наступним завданням було дослідження загальної целюлазної активності, що є важливим для даної роботи, адже вона інтегрально характеризує ефективність целюлазного комплексу [40]. Результати ілюструють, що найбільша целюлазна активність відбулась на 14 день і становила для *Trichoderma sp.* 1 – 0,129 IU/ml, *Trichoderma sp.* 2 – 0,241 IU/ml, *Trichoderma sp.* 3 – 0,334 IU/ml, *Trichoderma sp.* 4 – 0,198 IU/ml, *Trichoderma sp.* 5 – 0,268 IU/ml.

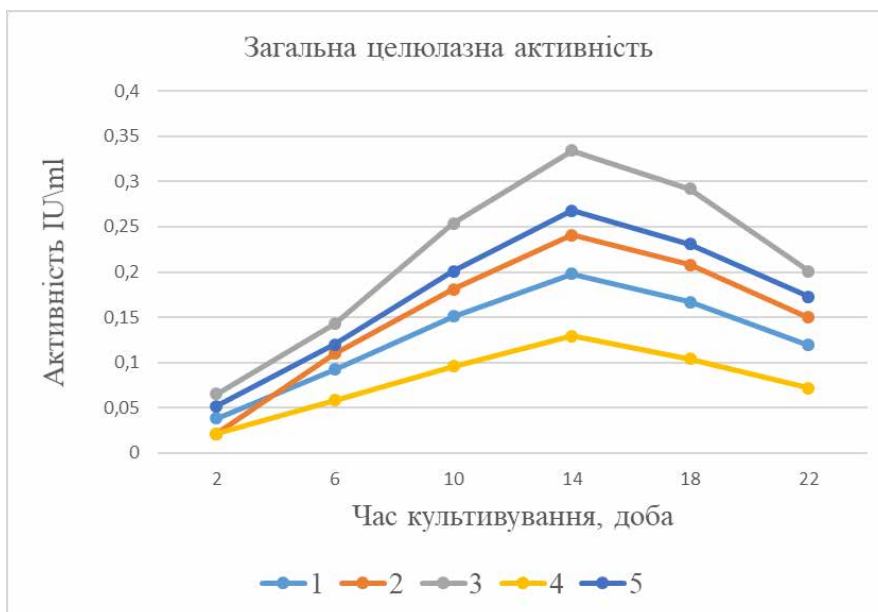


Рис 3.4 Загальна целюлазна активність грибів.

\*Джерело: сформовано автором

Отже, експериментально дослідивши активність окремих ферментів ми можемо стверджувати, що найкраще себе проявив 3 ізолят, він показав найбільшу здатність до синтезу всіх досліджуваних целюлозолітичних ферментів. Це може пояснюватися тим, що його відібрали з найбільш чистої культури та через фізіологічні особливості об'єкта. Найгіршим був ізолят під номером 4, його активність, порівняно з іншими досліджуваними об'єктами, була невисокою.

Найактивнішими всі ізоляти були на 2-3 тиждень, а саме 14 і 18 день, і активність їх в подальшому спадала. Ендоглюканаза проявила себе найактивніше, в той час коли  $\beta$ -глюкозидаза показала достатньо невисоку активність.

## ВИСНОВКИ

1. Проаналізувавши літературні джерела дослідили механізм біологічної деструкції лігноцелюлозного комплексу, розглянули основні мікроорганізми, здатні до синтезу ферментів, що деградують комплекс. Детально вивчили морфологію та ферментативні властивості *Trichoderma spp.*, а також біопрепарати створені на основі досліджуваного мікроміцета, їх переваги та недоліки.
2. Виділили досліджуваний об'єкт з ґрунту та культивували на поживному середовищі, відібрали 5 ізолятів, після розглянули морфолого-культуральні ознаки та ідентифікували мікроміцети. Колонії швидко росли, мали округлу форму з чіткими краями, спочатку мали білуватий колір, після набували зеленого або оливкового.
3. Для дослідження ферментативної активності модифікували середовище Чапека, де замість джерела вуглецю був фільтрувальний папір з метою змусити ізоляти до індукції целюлозолітичних ферментів. Після 5 днів культивування за формулою (2.1) вираховували ступінь деструкції. Найбільший ступінь мав ізолят під номером 3, найменший – 4. Після порівняння з контролем можемо стверджувати, що мікроміцети здатні до деградації целюлози.
4. Після підтвердження продукування ферментів ізолятами приступали до біохімічних тестів на екзоглюканазу, ендоглюканазу, загальну целюлазну активність та  $\beta$ -глюкозидазу. Для кожного з тестів культивували ізоляти протягом 21 дня і спостерігали за їх активністю. В усіх чотирьох тестах найбільш активний був 3 ізолят, найменш – ізолят під номером 4, що було очікувано з попередніх результатів.
5. Експериментально було доведено та підтверджено ефективність деградації лігноцелюлозного комплексу мікроміцетами роду *Trichoderma*.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Datta R. Enzymatic degradation of cellulose in soil: A review. 2024. P.1-3.  
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844024000537>
2. Pierre Beguin. Jean-Paul Aubert. The biological degradation of cellulose. 2019. P. 26-30.
3. Berlin A. No Barriers to Cellulose Breakdown. 2013. P. 15-20  
URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1247697#bibliography>
4. Anupama Sapkot, Sagar Aryal. Microbial degradation of cellulose (Enzymes, Steps, Mechanisms). 2022. P. 7-10
5. Gonzalez Basso Valeria, Di Barbaro Gabriela, Ribero Gustavo. *Trichoderma spp.*: characteristics and applications. 2024. P. 18. URL: <https://medcraveonline.com/JABB/ltigttrichoderma-ltigitspan-style=quotfont-style-normalquotgtssp-characteristics-and-applicationsltspangt.html>
6. Krishna Kumar, N. Amaresan, S. Bhagat, K. Madhuri, R.C. Srivastava. Isolation and Characterization of *Trichoderma spp.* for Antagonistic Activity Against Root Rot and Foliar Pathogens. 2011. P. 13-15.
7. Biotechnological tools for genetic improvement of *Trichoderma*. 2024. P. 214.  
URL: [https://www.researchgate.net/figure/Trichoderma-spp-morphology-A-and-B-phialides-C-spores-D-Conidiophores\\_fig1\\_379664414](https://www.researchgate.net/figure/Trichoderma-spp-morphology-A-and-B-phialides-C-spores-D-Conidiophores_fig1_379664414)
8. Błaszczyk L., Siwulski M., Sobieralski K., Lisiecka J., Jędryczka M. *Trichoderma spp.* – application and prospects for use in organic farming and industry. P. 309-311
9. Singh A., Shahid M., Srivastava M., Pandey S., Sharma A., and Kumar V. Optimal Physical Parameters for Growth of *Trichoderma* species at Varying pH, Temperature and Agitation. 2014. Vol.3. P. 1-7.
10. Mustafa A., Aslam Khan M., Inam-ul-Haq M., Aslam Pervez M., Umar U. Usefulness of different culture media for in-vitro evaluation of *Trichoderma spp.* against seed-borne fungi of economic importance. 2015. P. 84-86.
11. Manzar N., Shankar Kashyap A., Shankar Goutam R., Vikram Singh Rajawat M., Kumar Sharma P., Kumar Sharma S., Vardhan Singh H. *Trichoderma*: Advent

- of Versatile Biocontrol Agent, Its Secrets and Insights into Mechanism of Biocontrol Potential. 2022. P. 10-11.
12. Біопрепарати – альтернативний захист сільськогосподарських культур від хвороб та шкідників. 2019.  
URL: <https://consumer-cv.gov.ua/blog/2019/06/11/biopreparaty-alternatyvnyj-zahyst-silskogospodarskyh-kultur-vid-hvorob-ta-shkidnykiv/>
13. Ефект Біо® 10л. – деструктор пожнивних решток (деструктор стерні): веб-сайт.  
URL: <https://biona.ua/product/efekt-bio-3/?srsltid=AfmBOoo4BQjMypfvwphcWwEXhU7M9zrXy6H6WoFEpT0hmfk-08YGcma2>
14. ЕКОСТЕРН® Триходерма, КС: веб-сайт.  
URL: <https://btu-center.com/ecostern-trishoderma-ridkiy>
15. Деструктор МБК БІОТЕХНІКА, БІО КОМПЛЕКС: веб-сайт.  
URL: <https://centrbio.com.ua/ua/p773992031-destruktor-mbk-biotehnika.html?srsltid=AfmBOop2tU2QIsYfp2BJYr9QY87MZznRFrgLrTHCvjbQhmcKayQdyBz5>
16. Полько деструктор. Деструктор стерні 10л: веб-сайт.  
URL: [https://www.tava-agro.com.ua/product/destructor-stubble/?srsltid=AfmBOop6K7INvZ-YziWSPcZGwWd77kVsqHXIViRNcpKoYeJ\\_MkCMZniQ](https://www.tava-agro.com.ua/product/destructor-stubble/?srsltid=AfmBOop6K7INvZ-YziWSPcZGwWd77kVsqHXIViRNcpKoYeJ_MkCMZniQ)
17. Дестерн: веб-сайт. URL: <https://agroplant.com.ua/uk/destern>
18. Cavalcante R.S., Lima H., Pinto G., Gava C. A., Rodrigues S. Effect of Moisture on *Trichoderma* Conidia Production on Corn and Wheat Bran by Solid State Fermentation. 2017. P. 100-103.  
URL: [https://www.researchgate.net/publication/225613975\\_Effect\\_of\\_Moisture\\_on\\_Trichoderma\\_Conidia\\_Production\\_on\\_Corn\\_and\\_Wheat\\_Bran\\_by\\_Solid\\_State\\_Fermentation](https://www.researchgate.net/publication/225613975_Effect_of_Moisture_on_Trichoderma_Conidia_Production_on_Corn_and_Wheat_Bran_by_Solid_State_Fermentation)
19. De la Cruz Quiro R., Robledo Padilla F., Aguilar C. N., Roussos S. Forced Aeration Influence on the Production of Spores by *Trichoderma* strains. 2017. P.

- 2263-2265.
20. Pozo M., Herrero B., Martín García J., Santamaría O., Poveda J. Evaluating potential side effects of *Trichoderma* as biocontrol agent: A two-edged sword?. 2024. P. 3-6.
  21. Supyani, Hadiwiyono, SH Poromarto, Spriyadi, FI Permatasari. Negative impact of some fungicide applications on *Trichoderma harzianum* as biocontrol agent of shallot moler disease. 2023. P. 1-4.
  22. El-Sobky M. A., Eissa R. A., Abdel-Lateif K. S., Fahmi A. I., El-Zanaty A. M., Hassan M. M., Elsharkawy M. M. Genetic diversity assessment of *Trichoderma* spp. isolated from various Egyptian locations using its gene sequencing marker, rep-PCR, and their cellulolytic activity. 2024. P. 1-9.
  23. *Trichoderma: Ally or Enemy? Understanding its Role in Myciculture*: веб-сайт.  
URL: [https://lamycosphere.com/en-int/blogs/the-future-is-fungi/trichoderma-ally-or-enemy-understand-its-role-in-myciculture-and-agriculture?srsltid=AfmBOopqSrxdYzb3AMcIKCehTFLR8xk0Qqi\\_5WkkGS1SyX1Cb\\_mlk34H](https://lamycosphere.com/en-int/blogs/the-future-is-fungi/trichoderma-ally-or-enemy-understand-its-role-in-myciculture-and-agriculture?srsltid=AfmBOopqSrxdYzb3AMcIKCehTFLR8xk0Qqi_5WkkGS1SyX1Cb_mlk34H)
  24. Maruyama S. R., Bilesky-Jos N., Lima R., Fraceto L. F. Encapsulation of *Trichoderma harzianum* Preserves Enzymatic Activity and Enhances the Potential for Biological Control. 2020. P. 9-11.
  25. Glukhova L. B., Kaposhko D. K., Frank Y. A., Ivashenko D. A. Optimization of *Trichoderma* spp. industrial cultivation. 2020. P. 88-92.
  26. Elshahawy I. E., El-Sayed A. B. Maximizing the efficacy of *Trichoderma* to control *Cephalosporium maydis*, causing maize late wilt disease, using freshwater microalgae extracts. 2018. P. 2-10.
  27. Агар Чапека-Докса: веб-сайт.  
URL: <https://logiclab.com.ua/uk/sreda-chapeka-doksa-s-saharozoy-8820.html>
  28. Raut I., Constantin M., Vasilescu G., Arsene M. L., Jecu L., Sesan T. Optimization of *Trichoderma* strain for biocontrol cultivation activity. 2013. P. 154-156.

29. Коваленко Т.М. Мікробіологія та вірусологія : метод. вказівки. Вінниця : ВНАУ, 2023. 60 с.
30. Introduction to Fluorescence Microscopy : веб-сайт.  
URL:<https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy>
31. Darkfield Illumination : веб-сайт.  
URL:<https://evidentscientific.com/en/microscope-resource/knowledge-hub/techniques/darkfield>
32. Leboffe M.J., Pierce E. A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory : study guide. Englewood. 2015. 266 p.
33. Будова мікроскопа : веб-сайт.  
URL: <https://opticalmarket.com.ua/ua/budova-mikroskopa.html>
34. Мікроскопічні методи вивчення структури мікроорганізмів / Голодок Л.П., Черевач Н.В., Дрегваль О.А., Вінніков А. І. Дніпро : ДНУ ім. Олесья Гончара, 2012. 31 с.
35. Nezhad F.S., Rahnama K., Javidan S.M., Vakilian K.F. Application of microscopic image processing and artificial intelligence detecting and classifying the spores of three novel species of *Trichoderma*. 2024. P. 3.
36. Дімова С. Б., Деркач С. М., Волкогон В. В. Активність ферментного целюлозолітичного комплексу та антагоністичні властивості *Trichoderma harzium* 128. 2021. 14-19 с.
37. Копилов Є.П., Цехмістер Г.В. Целюлазна активність гриба *Acermonium sp.* 502, виділеного з уражених рослин огірків. 2015. 81-82 с.  
URL: <http://mbt.onu.edu.ua/article/view/48082/44284>
38. Йовенко А. С. Целюлозолітична активність гриба-антагоніста *Chaetomium cochliodes*, біоагента мікробного препарату хетоміка. Сільськогосподарська мікробіологія. 2016. с. 18–23.
39. Борзова Н. В., Варбанець Л. Д. Целюлозодеградуючі системи мікроорганізмів: біосинтез, властивості та структурнофункціональні особливості. Біотехнологія. 2009. с. 23–41.

40. Жданова Н. М., Олішевська С. В., Василевська А. І., Айзенберг В. Л., Курченко І. М. Скрінінг штамів мікроміцетів, що здатні рости та руйнувати целюлозовмісний субстрат. Мікробіологія і біотехнологія. 2008. № 3. С. 58–64.

## ДОДАТКИ

Додаток А



НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ  
І ЕКОЛОГІЇ

**ЗБІРНИК**

матеріалів доповідей

**XI МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ  
КОНФЕРЕНЦІЇ СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ**

**І МОЛОДИХ ВЧЕНИХ**

**«ЕКОЛОГІЯ – ФІЛОСОФІЯ ІСНУВАННЯ  
ЛЮДСТВА»**

**23-24 квітня 2025 р.**

Київ – 2025

<i>Герасько К., Міняйло А.А.</i> <b>ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ОРГАНІЗАЦІЇ МИСЛИВСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА ПО ЗАЙЦЮ СІРОМУ</b> .....	37
<i>Голік В.Р., Паламарчук С.П.</i> <b>ОСОБЛИВОСТІ ПРОВЕДЕННЯ ЕКОЛОГІЧНОЇ ОЦІНКИ В УКРАЇНІ ТА СВІТІ</b> .....	39
<i>Гончаренко Н.С., Бондарь В.І.</i> <b>ЕКОТОКСИКОЛОГІЧНЕ НАВАНТАЖЕННЯ НА ҐРУНТИ ВНАСЛІДОК БОЙОВИХ ДІЙ</b> .....	41
<i>Гончарук М.В., Кляченко О.Л.</i> <b>ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ IN VITRO GOSSYPIUM HIRSUTUM L.</b> .....	42
<i>Гордюта С.О., Нестерова Н.Г.</i> <b>ВПЛИВ ЗАСОЛЕННЯ ҐРУНТІВ НА ЕКОЛОГІЧНІ ПРОЦЕСИ В АГРОЕКОСИСТЕМАХ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЗМЕНШЕННЯ ЙОГО НЕГАТИВНИХ НАСЛІДКІВ</b> .....	44
<i>Гребельник О.Ю., Павлюк С.Д.</i> <b>ОЦІНКА ВПЛИВУ НА ДОВКІЛЛЯ СЛОВ'ЯНСЬКОЇ ТЕС</b> .....	46
<i>Гудзенко С.В., Клепко А.В.</i> <b>МІКРОБІОЛОГІЧНА ОЦІНКА ЯКОСТІ ВОДИ ВІДКРИТОЇ ВОДОЙМИ У СЕЛІ ХОТІВ КИЇВСЬКОЇ ОБЛАСТІ</b> .....	48
<i>Гулік С.В., Нестерова Н.Г.</i> <b>ФЕРМЕНТАТИВНЕ РОЗЩЕПЛЕННЯ ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗНОГО КОМПЛЕКСУ МІКРОМІЦЕТАМИ <i>TRICHODERMA SPP.</i></b> .....	50
<i>Дворецький А.В., Субін О.В.</i> <b>ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ <i>BUDDLEIA DAVIDII</i> В УМОВАХ IN VITRO</b> .....	51
<i>Діденко І.А., Слободяник В.Г.</i> <b>РОЛЬ ПАРКІВ У ЗБЕРЕЖЕННІ МІСЬКИХ ЕКОСИСТЕМ</b> .....	53
<i>Сфіменко О.Ю., Міняйло А.А., Дмитренко Л.А.</i> <b>ЕКОЛОГІЧНИХ НОРМАТИВІВ ВИДОБУВАННЯ КОРИСНИХ КОПАЛИН (НА ПРИКЛАДІ ТЕРНОПІЛЬСЬКОЇ ОБЛАСТІ)</b> .....	55
<i>Залозна В.А., Павлюк С.Д.</i> <b>ХІМІЧНА ПРОМИСЛОВІСТЬ ЯК ЧИННИК ЗАБРУДНЕННЯ ДОВКІЛЛЯ: ЛОКАЛЬНИЙ АНАЛІЗ ПІДПРИСМСТВА ТОВ «ТСХ-ХІМРЕАКТИВ»</b> .....	57
<i>Львін І.С., Слинько А.Ю., Кудрявицька А.М.</i> <b>ЗНАЧЕННЯ АГРОФІЗІОЛОГІЧНИХ ЗАХОДІВ ПРИ УПРАВЛІННІ ПРОДУКЦІЙНИМ ПРОЦЕСОМ ЗА ВИРОЩУВАННЯ ЯРОЇ ПШЕНИЦІ СОРТУ МИРОНІВСЬКА-ЯРА В УМОВАХ ПІВНІЧНОЇ ЧАСТИНИ ЛІСОСТЕПУ УКРАЇНИ</b> .....	59
<i>Калач П.І., Ладика М.М.</i> <b>ЕКОЛОГІЧНИЙ СТАН РІЧКИ ДУНАЙ</b> .....	61
<i>Климчук А.І., Дащенко А.В.</i> <b>ВІРУСНІ ТА ГРИБНІ ХВОРОБИ ПШЕНИЦІ В УКРАЇНІ ТА МЕХАНІЗМИ ВПЛИВУ ІМУНІТЕТУ</b> .....	63

УДК 602.4.2:517.152.3

**ФЕРМЕНТАТИВНЕ РОЗЩЕПЛЕННЯ ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗНОГО КОМПЛЕКСУ  
МІКРОМІЦЕТАМИ *TRICHODERMA SPP.***

*Гулік С.В.*, студентка 4 курсу, факультету захисту рослин, біотехнологій та екології

*Нестерова Н.Г.*, кандидат с.-г. наук, доцент кафедри фізіології, біохімії рослин та  
біоенергетики

*Національний університет біоресурсів і природокористування України*

Зростання обсягів рослинних відходів у сільському господарстві становить серйозну екологічну проблему, пов'язану з необхідністю ефективної та безпечної утилізації біомаси. Лігноцелюлозні комплекси, що складаються переважно з целюлози, геміцелюлози та лігніну, є стійкими до природного розкладу через високу полімеризацію та кристалічність целюлози, а також гідрофобність і структурну складність лігніну. У зв'язку з цим розробка біотехнологічних підходів до деструкції таких субстратів набуває особливого значення.

Мікроміцети роду *Trichoderma* відомі своєю здатністю синтезувати широкий спектр гідролітичних та окислювальних ферментів, зокрема целюлаз, а також ферментів, здатних модифікувати або частково розкласти лігнін [1]. Їх застосування в біоконверсії лігноцелюлозних матеріалів відкриває перспективи не лише для ефективної утилізації рослинних відходів, але й для одержання цінних вторинних продуктів — простих цукрів, органічних кислот, біогазу, біоетанолу тощо. Вивчення ферментативного потенціалу *Trichoderma spp.* та оптимізація умов їхнього культивування з метою максимізації деградаційної активності є важливим кроком на шляху до створення екологічно сталих технологій переробки біомаси.

Метою дослідження було встановлення ферментативної активності мікроміцетів роду *Trichoderma* до деструкції лігноцелюлозного комплексу рослинних відходів, а також характеристика активності основних ферментів, що беруть участь у деструкції целюлози та геміцелюлози для оптимізації біотехнологічних процесів.

У ході дослідження для виділення *Trichoderma spp.* з ґрунту було використано селективне поживне середовище Чапека, яке містить глюкозу як джерело вуглецю та нітрат натрію як джерело азоту. Середовище пригнічує ріст бактерій, що сприяє ізоляції цвілевих грибів. Ґрунтові зразки відбирали з орної ділянки, змішували в один об'єднаний зразок і з нього готували ґрунтову суспензію. Суспензію розводили серійно, для зниження мікробного навантаження. Посіви проводили методом поверхневого нанесення на тверде середовище Чапека в асептичних умовах. Чашки інкубували при температурі 25°C для росту колоній *Trichoderma*. Для ідентифікації використовували світлопольний мікроскоп, оскільки він забезпечує хорошу видимість забарвлених клітин і є зручним у використанні. Для

мікроскопії препаратів обрали метод «відбитка», що дозволяє дослідити морфологію грибів та розташування клітин.

Для оцінки ферментативної активності мікроміцетів їх культивували у рідкому модифікованому середовищі Чапека-Докса, де єдиним джерелом вуглецю був фільтрувальний папір (8 г). Це змушувало гриби синтезувати ферменти для розщеплення целюлози. Після культивування суспензію центрифугували й фільтрували, а залишки субстрату висушували для обчислення ступеня деструкції за зміною маси. Активність оцінювали кожні 4 дні протягом 3 тижнів.

Вже на перший тиждень фіксувалося помітне зниження маси паперу, що свідчило про початок активного ферментативного розщеплення целюлози. Найінтенсивніше зниження маси субстрату відбувалося на другому тижні, а до третього тижня спостерігалось стабільне наростання ступеня деструкції, що свідчить про збереження високої ферментативної активності протягом усього періоду культивування. Отримані дані підтверджують здатність виділених штамів *Trichoderma* ефективно синтезувати целюлозолітичні ферменти та потенційну можливість їх застосування для біодеструкції рослинних відходів.

#### Список використаних джерел

1. Anurama Sapakota, Sagar Aryal. Microbial degradation of cellulose (Enzymes, Steps, Mechanisms). 2022 URL: <https://microbenotes.com/microbial-degradation-of-cellulose/>
2. С.Б. Дімова, С.М. Деркач, В.В. Волкогон. Активність ферментного целюлозлітичного комплексу та антагоністичні властивості *Trichoderma harzianum* 128. 2021. С. 13-15.