

**ДНІПРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ОЛЕСЯ ГОНЧАРА**

**Факультет біолого-екологічний
Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології**

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

Другий (магістерський) рівень вищої освіти
за спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія,

на тему: «Оптимізація складу виробничого середовища для
культивування *Trichoderma viridae* КМВ-F-15, основи біофунгіцидного
препарату»

Виконавець:
студентка VI курсу групи БН-22м-1
Лесична Аліна Василівна

Керівник:
канд.біол.наук,доц.кафедри мікробіології,
вірусології та біотехнології
ЛихолатТетянаЮріївна

Завідувач випускної кафедри
Мікробіології, вірусології та
біотехнології
канд.біол.наук,доцент
Скляр Тетяна Володимирівна

РЕФЕРАТ

Випускна робота магістра: с.74, табл.10, рис.14, джерел 73.

Об'єктом дослідження був вихід біомаси *Trichoderma viride* КМВ-F-15 залежно від складу поживного середовища та фунгістатична активність фільтрату культуральної рідини гриба по відношенню до фітопатогенного гриба *Fusarium culmorum* ІМВ-F-50716.

Мета дипломної роботи: оптимізація складу поживного середовища для отримання біопрепарату на основі *Trichoderma viride* КМВ-F-15.

Методика дослідження: в роботі використовувалися мікробіологічні, мікроскопічні, хімічні, математичні та статистичні методи досліджень. Суху біомасу гриба визначали ваговим методом; фунгістатичну дію фільтрату культуральної рідини триходерми визначали методом агарових блоків у модифікації М. В. Соколової та Г. В. Калько; оптимізацію кількісного складу поживного середовища здійснювали методом повного факторного експерименту та «крутого сходження», статистичну обробку даних здійснювали за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Excel 2016 та Statgraphics Centurion XV version 15.01.02.

Одержані результати та їх новизна: досліджено вплив джерел вуглецю та азоту на вихід біомаси та антагоністичну активність *Trichoderma viride* КМВ-F-15 відносно фітопатогенного гриба *Fusarium culmorum* ІМВ-F-50716; визначено оптимальний кількісний склад компонентів поживного середовища на основі гліцерину, амонію хлористого та двозаміщеного фосфорнокислого калію для вирощування *T. viride* КМВ-F-15 в умовах глибинного культивування. Порівняно з вихідним середовищем вихід сухої біомаси гриба збільшився в 2,8 раз і склав 4,7 г/л.

Отримані результати є науковою основою для виробництва біологічних засобів захисту рослин від збудників хвороб.

Ключові слова: МІКРОМІЦЕТИ, TRICHODERMA, НАКОПИЧЕННЯ БІОМАСИ, ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ, АНТАГОНІЗМ, ФІТОПАТОГЕНИ.

RESUME

Graduation work of the master: p.74, table 10, picture 14, source 73.

The object of study was the *Trichoderma viride* KMV-F-15 biomass depending on the composition of the nutrient medium and the fungistatic activity of the filtrate of the culture liquid of the mushroom in relation to the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum* IMB-F-50716.

The aim of the thesis: optimization of the composition of the nutrient medium for obtaining a biological preparation based on *Trichoderma viride* KMV-F-15.

Research methodology: microbiological, microscopic, chemical and statistical research methods were used in the work. The dry biomass of the mushroom was determined by the weight method; the fungistatic effect of the trichoderma culture fluid filtrate was determined by the method of agar blocks in the modification of M. V. Sokolova and G. V. Kalko; optimization of the quantitative composition of the nutrient medium was carried out by the method of full factorial experiment and "steep ascent", statistical data processing was carried out using Microsoft Excel 2016 and Statgraphics Centurion XV version 15.01.02 computer programs.

Obtained results and their novelty: the effect of carbon and nitrogen sources on biomass yield and antagonistic activity of *Trichoderma viride* KMB-F-15 against phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum* IMB-F-50716 was investigated; the optimal quantitative composition of nutrient medium components based on glycerol, ammonium chloride and disubstituted potassium phosphate for growing *T. viride* KMV-F-15 in deep cultivation conditions was determined. Compared to the original medium, the yield of dry biomass of the mushroom increased by 2,8 times and amounted to 4,7 g/l.

The obtained results are a scientific basis for the production of biological means of protecting plants from plant pathogens.

Key words: MICROMYCETES, TRICHODERMA, BIOMASS ACCUMULATION, NUTRIENT ENVIRONMENT, ANTAGONISM, PHYTOPATHOGENS.

Зміст

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ <i>TRICHODERMA</i>	8
1.2. ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ГРИБІВ <i>TRICHODERMA</i>	11
1.2.1. Використання <i>Trichoderma</i> в рослинництві.....	11
1.2.1.1. Вплив на рослини при абіотичному стресі.....	14
1.2.1.2. Властивості <i>Trichoderma</i> для сприяння росту рослин.....	16
1.2.1.3. Контроль патогенів	21
1.2.2. Використання грибів роду <i>Trichoderma</i> у сфері екології.....	24
1.2.3. Використання грибів роду <i>Trichoderma</i> у медицині.....	25
1.2.4. Використання грибів роду <i>Trichoderma</i> у синтезі наночастинок.....	25
1.2.5. Використання грибів роду <i>Trichoderma</i> у тваринництві	31
1.2.6. Гриби роду <i>Trichoderma</i> – продуценти ферментів.....	32
1.2.7. Метаболіти грибів роду <i>Trichoderma</i>	32
1.3. Особливості культивування <i>Trichoderma</i>	36
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	38
2.1. Повний факторний експеримент.....	39
2.2. Метод крутого сходження	43
2.3. Ваговий метод визначення виходу біомаси	43
2.4. Метод агарових блоків для визначення фунгістатичної активності	44
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	45

3.1. Дослідження впливу сполук вуглецю на накопичення біомаси та фунгістатичну дію штаму <i>Trichoderma viride</i> КМВ-F-15	46
3.2. Дослідження впливу сполук азоту на накопичення біомаси та фунгістатичну дію <i>Trichoderma viride</i> КМВ-F-15	50
3.3. Повний факторний експеримент	55
3.4. Оптимізація кількісного складу поживного середовища за методом «крутого сходження»	60
ВИСНОВКИ	65
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	67

ВСТУП

Мікроміцети роду *Trichoderma* – найпоширеніші біологічні агенти, які на сьогоднішній день використовуються в сільському господарстві. Представники роду *Trichoderma* можуть сприяти росту і продуктивності рослин, контролювати розповсюдженість шкідників та патогенів, полегшувати абіотичний стрес та виробляти промислово важливі метаболіти, ферменти. Використання засобів біоконтролю є одним із стійких підходів до вирощування сільськогосподарських культур з численними перевагами, включаючи підвищення захисту від хвороб і врожайності, а також зниження хімічного впливу на навколишнє середовище. У всьому світі в даний час більше 60% ефективних біофунгіцидів отримують з *Trichoderma*.

Отримання грибних препаратів можливе як екстенсивним поверхневим методом, так і більш економічним глибинним. Головними показниками придатності живильних середовищ для промислового культивування штамів-продуцентів є стабільно висока продуктивність мікроорганізмів при рості у цих середовищах. Оптимальний склад середовища може бути визначений двома способами: методом емпіричного підбору та з використання методів математичного планування експерименту. При використанні методу математичного планування можна визначити кількісний склад середовища, щоб отримати максимальний вихід продукту.

Мета роботи: оптимізація складу поживного середовища для отримання біопрепарату на основі *Trichoderma viride* КМВ-F-15.

Для реалізації мети були поставлені наступні завдання:

- дослідити вплив джерел вуглецю на накопичення біомаси та фунгістатичну активність *Trichoderma viride* КМВ-F-15;
- дослідити вплив джерел азоту на накопичення біомаси та фунгістатичну активність *Trichoderma viride* КМВ-F-15;

- за допомогою повного факторного експерименту отримати математичну модель росту *Trichoderma viride* КМВ-F-15 залежно від складу компонентів поживного середовища;
- на основі отриманої математичної моделі оптимізувати кількісний склад поживного середовища за методом «крутого сходження».

РОЗДІЛ 1. Огляд літератури

1.1. Загальна характеристика представників роду *Trichoderma*

Trichoderma — це мікроміцет біоконтролю, широко поширений у всьому світі. Він має величезне застосування та потенціал у галузі біологічного контролю хвороб рослин. У всьому світі є згадки про дослідження використання для боротьби з хворобами рослин. *T. viride* та *T. harzianum* мають різний ступінь інгібуючої дії на 29 видів рослинопатогенних грибів 18 родів, у тому числі *Botrytis*, *Fusarium* та *Rhizoctonia*[1].

Цей рід родини *Hydrocreaceae* демонструє швидкий вегетативний ріст (2 см на день – 1 або більше за ідеальних умов) і утворює велику кількість нестатевих спор (наприклад, *T. viride* має конідії діаметром 3–5 мкм і хламідоспори діаметром 8–10 мкм). Конідії є найпоширенішим типом клітин, які утворюються шляхом нестатевого розмноження і дозволяють поширювати гриб. Загалом *Trichoderma* найкраще розмножуються шляхом колонізації коренів у ризосфері рослин, і в результаті міцелій випередить конкуренцію з патогенними грибами та синергічно посилить розвиток рослин. Кілька досліджень продемонстрували значну кількість механізмів біоконтролю, які використовують *Trichoderma*, включаючи мікопаразитизм, антибіоз, конкуренцію за поживні речовини чи простір, стійкість до стресу через посилений розвиток коренів і рослин, солубілізацію та секвестрацію неорганічних поживних речовин, набуту системну резистентність та інактивацію ферментів.

У результаті *Trichoderma* набули значного комерційного інтересу як агенти біологічного контролю для кількох поширених захворювань рослин, включаючи кореневу гниль, хвороби в'янення та інших хвороб, а також для профілактичної обробки деревини від грибків гниття. *Trichoderma* є провідним комерціалізованим агентом біологічного контролю на світовому ринку [2].

Представники роду *Trichoderma* є біотрофними, гемібіотрофними, сапробними або гіперсапробними на різних рослинах або інших грибахі були визначені як антагоністи з найбільшим потенціалом. Вони були використані в кількох сферах боротьби з грибковими захворюваннями рослин. Двадцять п'ять відомих видів *Trichoderma* мають великий потенціал для значного контролю понад 100 грибкових патогенів рослин у всьому світі. З цих видів *Trichoderma harzianum* можна вважати найпоширенішим і комерційно розробленим агентом біологічного контролю, що використовується для широкого спектру грибкових захворювань рослин. Види *Trichoderma* виробляють низку метаболітів, і ці метаболіти відіграють важливу роль у механізмах біологічного контролю [3].

Гриби *Trichoderma* виявляють високу стійкість до багатьох токсичних сполук, що виробляються іншими мікроорганізмами, включаючи антибіотики, а також до терпеноїдних фітоалексинів і пероксидаз, що виділяються рослинами, а також до фунгіцидів і важких металів. Виходячи з молекулярних досліджень, стійкість, яка робить ці гриби активними колонізаторами та сильними конкурентами, може бути пов'язана зі здатністю *Trichoderma* для виробництва білкових транспортерів abc [4].

Види *Trichoderma* пристосувалися до безлічі екосистем, де вони відіграють важливу роль у здоров'ї екосистеми. Ці гриби часто є переважаючими компонентами мікофлори в природних і сільськогосподарських ґрунтах, колонізують коріння рослин, у деяких випадках надземні частини рослин і навіть можуть рости як ендоефіти [5].

Trichoderma viride має оптимальний ріст при 25 °C і не росте при 35 °C; його можна виділити з ґрунту та органіки, деякі його штами мають слабкий кокосовий запах, конідії можна спостерігати через 2 дні. *T. viride* вважається типовим видом роду *Trichoderma*, і це один із найпоширеніших видів, які зустрічаються в ґрунті.

Цей вид використовується як засіб біоконтролю, особливо завдяки його мікопаразитарній здатності. *T. viride* може мікопаразитувати з грибковими

збудниками, такими як *F. moniliforme*, *Cryphonectria parasitica* та *Schizophyllum commune*. Використання комерційних хітиназ, отриманих із *T. viride* завдає шкоди шовкопряду *Bombix mori*, що свідчить про здатність цього гриба розщеплювати хітин комах, які можуть спричиняти хвороби рослин.

Є декілька механізмів біоконтролю *T. viride*:

Паразитизм і конкуренція

Змагаючись за простір і поживні речовини в аналізах подвійної культури *T. viride* виявив антагоністичну активність проти збудника *Sclerotinia sclerotiorum*, демонструючи чітку зону інгібування в культуральних чашках на 4 день взаємодії, що вказує на механізми антибіозу, що здійснюються *T. viride* над патогеном, і 67,284% пригнічення росту на 6 день конфронтації. У аналізах подвійної конфронтації *T. viride* виявив антагоністичну активність щодо збудників *Fusarium solani*, *R. solani*, та *S. rolfsii*, що обмежує їх зростання на 29,76%, 15,27% і 19,73% відповідно.

Вторинні метаболіти

T. viride продукує SM з протигрибковою активністю. Неочищений екстракт міцелію та спиртовий екстракт цього гриба виявили протигрибкову активність проти *Candida albicans*, *Fusarium solani*, *Bacillus subtilis*, *P. solani* та *F. solani*, *C. albicans* та антибактеріальну активність проти *E. coli* і *B. Subtilis*. ЛОС від *T. viride* ВНУ-V2 виявив антагоністичну активність проти *S. rolfsii*, пригнічуючи ріст патогенів як *in vitro*, так і в ґрунтових експериментах. Було встановлено, що ЛОС здатні змінювати структуру гіфи збудника, таким чином обмежуючи його ріст. Сінгх і його співробітники також показали, що ЛОС з *T. viride* підвищують активність PAL, PPO, хітинази і β -1,3-глюканази в рослинах бамії, індукуючи стійкість і зменшуючи загибель клітин, спричинену *S. rolfsii*.

Індукція захисту рослин

В експериментах у теплицях інокуляція *T. viride* окремо або в комбінації з *Trichoderma erinaceum* пригнічує захворювання, спричинене

Sclerotinia sclerotiorum у *Phaseolus vulgaris* cv. рослини *Anupama*. Тим не менш, комбінація цих агентів біоконтролю дала кращі результати. Кумар і його співробітники також виявили, що рослини, попередньо оброблені *Trichoderma* або їх комбінацією зменшує накопичення АФК, спричинене патогеном, підвищуючи антиоксидантну активність у рослинах [6].

1.2. Практичне значення грибів *Trichoderma*

1.2.1. Використання *Trichoderma* в рослинництві

Біологічний контроль або біоконтроль у широкому сенсі визначається як використання живих організмів для боротьби зі шкідниками, такими як комахи, бур'яни, паразити, патогенні гриби чи інші інвазивні види. Незважаючи на велику кількість складнощів, концепція біологічного контролю стає все більш важливою в останні роки через тиск законодавства та споживачів щодо поступової відмови або скорочення використання традиційних хімічних пестицидів у сільськогосподарській практиці.

Одним із найбільш широко досліджених агентів біологічного контролю є *Trichoderma*, який включає всюдисущі мезофільні гриби, що характеризуються видатною здатністю колонізувати різні середовища та як результат, їх можна знайти майже в усіх ґрунтових середовищах існування[7].

Потенціал видів *Trichoderma* як біологічних засобів захисту рослин був вперше описаний на початку 1930-х років. Дослідник Вейндлінг зауважив, що *T. lignorum* захищає саджанці цитрусових від збудника *Rhizoctonia solani* за допомогою механізму некротрофного мікопаразитизму. Відтоді біоконтрольні властивості цього гриба були широко вивчені для контролю хвороб, спричинених численними ґрунтовими фітопатогенами. Найбільш ефективні властивості біоконтролю в основному приписуються *T. virens*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii*, *T. longibrachiatum*, *T. asperellum*, *T. polysporum* *T. viride*, які мають значний вплив на розвиток хвороб рослин,

спричинених *R. solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium aphanidermatum*, *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* і *Fusarium culmorum*, як в теплиці, так і в польових умовах. Крім того, внесення в ґрунт штамів *Trichoderma* підвищило продуктивність і якість однодольних і дводольних культур, таких як огірки, помідори, морква, квасоля, кукурудза, бавовна, тютюн, просо та декоративні трави. Стимулююча дія *Trichoderma* на рослини, ймовірно, пов'язана з їхньою участю у взаємозв'язку між гормонами росту, синтезованими цими грибами, та захисними гормонами, індукованими ними в рослина [8].

Trichoderma в основному використовується для боротьби з хворобами, що передаються через ґрунт, а також деякими хворобами листя та волоті різних рослин. Гриб може не тільки запобігти захворюванням, але й сприяє росту рослин, покращує ефективність використання поживних речовин, підвищує стійкість рослин і покращує агрохімічне забруднення середовища. Препарати *Trichoderma* це безпечний, недорогий, ефективний, екологічно чистий засіб біоконтролю для різних видів сільськогосподарських культур [1].

Гриби з роду *Trichoderma* є одними з найбільш використовуваних і досліджених мікроорганізмів як агент біологічного контролю завдяки різноманітності властивостей біоконтролю, таких як паразитизм, антибіоз, вторинні метаболіти виробництво та індукція системи захисту рослин.

Фактично, від 50 до 60% світового ринку засобів біологічного контролю у всьому світі базується на вмісті кількох видів *Trichoderma*. Контролююча дія цих біопестицидів на основі *Trichoderma* в основному включає збудників грибів і ооміцетів, таких як *Acremonium cucurbitacearum*, серед іншого *Verticillium dahliae* spp., *Sclerotium* spp., *Serpula* spp., *Pythium*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus oryzae*, *Phoma betae*, *Lasiodiplodia theobroma*, *tritici* var. *Gaeumannomyces graminis* spp., *Fusarium*, *Diplodia natalensis* spp., *Collisletnicios* spp., *Collisletotnicios* spp., *Botrytis*, *Botrytis cinerea*, *Lasiodiplodia theobromae* spp., *Aphanomyces cochlioides*, *Aspergillus* spp., *Alternaria*[9].

T. hamatum має кілька корисних властивостей, таких як антимікробна активність, антиоксидантна активність, інсектицидна активність, гербіцидна активність і стимуляція росту рослин; крім того, він має кілька інших корисних властивостей, таких як стійкість до дихлордифенілтрихлоретану (ДДТ) і розкладання ДДТ певними ферментами, виробництво певних ферментів, що розкладають полісахариди [10].

Оцінено реакцію трьох видів *Trichoderma*. (*T. atroviride*, *T. asperellum* та *T. saturnisporum*) до змінних навколишнього середовища, таких як температура та активність води, а також їхньої антагоністичної здатності проти *Fusarium oxysporum* на спаржу. Усі три види *Trichoderma* пригнічували ріст збудника *in vitro*. Зниження активності води призвело до більшого зниження швидкості росту. Ефективність трьох біологічних засобів контролю знижувалася з підвищенням температури, що призводило до мінімального інгібування, особливо в умовах обмеженої доступності води в навколишньому середовищі. Вплив щільності інокулята грибів також аналізували при двох різних температурах. Спостерігалася пряма кореляція між кількістю інокулята та балом за індексом тяжкості захворювання (DSI). Помітне зниження DSI було очевидним при обробці з високою щільністю інокулята (10⁶ конідій/мл) для всіх трьох видів *Trichoderma*, перевірено за обох температур. Під час випробувань у теплицях і напівпольових умовах спостерігали менший контроль хвороб, ніж очікувалося, хоча *T. asperellum* і *T. atroviride* показали нижчі показники ураження захворювання та збільшення сухої маси саджанців і крон, тоді як *T. saturnisporum* призвело до найвищого рівня захворювання та найменшої сухої маси [11].

Сприятливий вплив видів *Trichoderma* на рослини включає стимулювання їх росту, покращення структури та стану коренів, підвищення проростання та життєздатності насіння, а також підвищення ефективності фотосинтезу, цвітіння та якості врожаю. Інокуляція гриба збільшила загальну біомасу, висоту розсади, діаметр ґрунту, довжину кореня, площу кореня, діаметр кореня, кількість верхівок кореня та кількість гілок *P. sylvestris* var.

mongolica розсади, тим самим збільшуючи площу поглинання та потенціал росту [12].

Trichoderma може підтримувати ріст рослин шляхом вироблення фітогормонів та сидерофори, солюбілізація та мінералізація мікро- та макроелементів та деградація попередника етилену — АЦЦ (1-аміноциклопропан-1-карбоксилат) [13].

1.2.1.1. Вплив на рослини при абіотичному стресі

Присутність *Trichoderma* в ризосфері та тканинах рослин призводить до підвищення стійкості рослин до біотичних і абіотичних стресів. Найшкідливішими екологічними стресами, які загрожують врожайності, є посуха, засолення, накопичення важких металів і екстремальні температури.

Несприятливі умови навколишнього середовища можуть порушити процес фотосинтезу, створити високий вміст АФК, вплинути на переміщення поживних речовин і змінити гормональний баланс рослин, викликаючи пошкодження клітин і некроз рослин [14].

Посуха є основним фактором абіотичного стресу, що впливає на ріст і продуктивність рослин. Рослини реагують на таке несприятливе середовище як прямо, так і опосередковано, а непрямі реакції через змінені взаємодії між видами привернули підвищену увагу.

Вплив подвійної інокуляції на бактеріальну спільноту був більшим, ніж на грибову спільноту, а комбінація *P. putaminum* та *T. viride* мала сильніший вплив на мікробіом під час посухового стресу. Спостережувані зміни в ґрунтових факторах, спричинені інокуляцією, можна пояснити варіаціями складу мікробіому. Ризосферний мікробіом, опосередкований інокуляцією, демонстрував чіткі переваги щодо різних параметрів росту. Ці результати свідчать про те, що подвійне щеплення *DSE* та *T. viride* збагачує корисну мікробіоту, змінює стан поживних речовин у ґрунті та може сприяти покращенню вирощування лікарських рослин у посушливому сільському господарстві [15].

T. viride може підвищити стійкість розсади помідорів до сольового стресу на морфологічному та фізико-біохімічному рівнях, активуючи як ферментативні, так і неферментативні системи антиоксидантного захисту. Отже використання *T. viride* пропонується як хороше рішення та може бути запропоновано для використання фермерами як ефективна, а також економічно ефективна стратегія проти засолення [16].

Щеплення розсади томатів *T. harzianum* в умовах солоності та посухи призвело до підтримки ефективності фотосинтезу та фактично зменшило накопичення АФК. Крім того, інокуляція проростків пшениці конідій штаму *T. longibrachiatum* підвищили стійкість пшениці до сольового стресу та значно підвищили концентрацію антиоксидантних ферментів. Встановлено, що рослини ріпаку (*Brassica napus L.*), інокульовані *T. parareesei* мали високу толерантність до солі та окисного стресу. При кореневій інокуляції цим штамом рослини ріпаку показали значно більшу врожайність порівняно з неінокульованими рослинами. Крім того, *T. parareesei* підвищив стійкість ріпаку до засолення та посухи за рахунок збільшення експресії ACCO1 та PYL4 генів, пов'язаних з гормональними шляхами АВА та ЕТ. Тверда пшениця, інокульована *T. harzianum* продемонстрував вищу толерантність до помірного посухового стресу на 52% за оптимального внесення азотних добрив; проте доступність поживних речовин у ґрунті та умови навколишнього середовища значно вплинули на цю реакцію [17].

Було виявлено, що *Trichoderma* підвищує стійкість рослини до низьких температур. Інокуляція рослин томатів (*Solanum lycopersicum L.*) препаратом *T. harzianum* ефективно пом'якшував несприятливі наслідки холодного стресу, що призводило до збільшення свіжої та сухої маси пагонів і коренів, а також покращувало фотосинтез, швидкість росту та вміст води в листі.

Крім того, ферменти та метаболічні білки, що кодують гени TAS14 та P5CS посередньої стійкості рослин до низькотемпературного стресу була підвищена за допомогою *T. harzianum*. *T. koningii* виявився корисним у наданні рослинам томатів стійкості до теплового стресу завдяки посиленій

модуляції антиоксидантів. Застосування цього штаму зменшило накопичення АФК і захистило рослинні клітини від окислювального пошкодження в умовах високотемпературного стресу [18].

1.2.1.2. Властивості *Trichoderma* для сприяння росту рослин

Trichoderma часто асоціюється з кореневими екосистемами рослин-господарів, тому цей мікроміцет зазвичай визначають як рід симбіотичних, умовно-патогенних та авірулентних мікроорганізмів, які колонізують коріння та стимулюють ріст рослин за допомогою механізмів, подібних до тих, які використовує мікоризні гриби [19].

Сприятливий вплив видів *Trichoderma* на рослини включає стимулювання їх росту, покращення структури та стану коренів, підвищення проростання та життєздатності насіння, а також підвищення ефективності фотосинтезу, цвітіння та якості врожаю [20].

1. Коренева колонізація рослин

Численні види ризосфери *Trichoderma* можуть колонізувати поверхні коренів як однодольних, так і дводольних рослин, що призводить до значних змін у метаболізмі рослин. Колонізація коренів раніше спостерігалася переважно в корневих волосках і зоні подовження, однак нещодавні дослідження підтвердили колонізацію цими грибами зони прикордонних клітин кореневої шапки.

2. Синтез фітогормонів і метаболітів, що впливають на фітогормональний баланс

Мікробне виробництво фітогормонів і фіторегуляторів є одним із прямих механізмів, що сприяє швидкому та стабільному заселенню ґрунту мікроорганізмами та їхньому стимулюючому впливу на ріст рослин. Крім того, колонізація рослинних тканин ґрунтовими мікроорганізмами, що синтезують фітогормони, впливає на гормональний баланс рослин і їх взаємодію з мікроорганізмами. Мікробні фітогормони відіграють вирішальну роль у сільському господарстві зі зростаючим інтересом до їх промислового виробництва, особливо з використанням грибних культур. Кілька

представників роду *Trichoderma* характеризуються здатністю виробляти фітогормони (ауксин і гіберелін) і фіторегулятори, зокрема 1-аміноциклопропан-1-карбонову кислоту, фермент дезаміназу, який регулює шлях біосинтезу етилену, синтез гормону індол-3-оцтової кислоти.

Trichoderma призводить до посилення колонізаційної здатності ризосфери, ризоплани та коренів однодольних і дводольних, що спостерігалось під час взаємодії *T. harzianum* з огірком. Крім того, стимуляцію росту коренів огірка посилював *T. asperellum* штам Q1, здатний продукувати комплекс гормонів росту (ІУК, гіберелін та АБК). Також, спостерігався посилений ріст проростків пшениці після інокуляції штамом *Trichoderma*, здатним продукувати ІАА, гіберелін та АСС дезаміназу.

3. Солюбілізація поживних речовин і підвищення біодоступності основних елементів

Trichoderma відіграє вирішальну роль у посиленні росту рослин шляхом утворення вітамінів, підвищення розчинності поживних речовин, що містяться в ризосфері (фосфати, Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{4+} , ZnO), а також доповнення рослини необхідними елементами (головним чином азотом, фосфором, калієм і мікроелементами) для їх правильного росту і врожаю.

Серед усіх поживних речовин для рослин фосфор (P), ймовірно, присутній у ґрунті у формах із найбільш обмеженою біодоступністю для рослин. Було експериментально продемонстровано, що внесення в ґрунт штамів *Trichoderma* збільшує розчинення неорганічного фосфату завдяки активності позаклітинної фітази та підкислення ґрунтового середовища шляхом виробництва оцтової, масляної, лимонної та фумарової кислот. Здатність мікроміцета розчиняти фосфати корелювала з покращеними бобами, пшеницею, рисом, соєю, і зростання мангрових лісів.

Дослідження, проведене Лі та інших показали підвищене поглинання поживних речовин (P, K, Mg і Zn) рослинами томатів після попередньої інокуляції *T. asperellum* штаму CHF 78. Крім того, *T. harzianum*, що продукує в рідких культурах дифузійні метаболіти, здатні відновлювати Fe(III) та

Cu(II). Singh та інші довели, що *T. asperellum* T42 опосередковував збільшення біомаси господаря, загального вмісту азоту, виробництва оксиду азоту (NO) і накопичення цитозольного Ca^{2+} в тютюні [21].

Дефіцит фосфору (Pi) є основним фактором обмеження росту рослин. Використання фосфат-солюбілізуючих мікроорганізмів (PSM) у взаємодії з кореневою системою рослин, які постачають рослинам розчинний P, є екологічно чистим та ефективним способом використання фосфору. *Trichoderma viride* є агентом біоконтролю, який здатний солюбілізувати поживні речовини ґрунту, але мало відомо про його розчинні властивості Pi. У дослідженні використовувався мікроміцет *T. viride* для щеплення *Melilotus officinalis* при різних рівнях Pi для того, щоб дослідити вплив на поглинання Pi і ріст проростків. Результати показали, що *T. viride* міг не тільки солюбілізувати нерозчинний неорганічний Pi, але й мінералізувати нерозчинний органічний Pi. Крім того, здатність мінералізації до нерозчинного органічного Pi сильніша. За різних рівнів Pi, *T. viride* показала, що сприяла росту надземних частин розсади та регулювали морфологію коренів, таким чином збільшуючи суху вагу саджанців. Ефект *T. viride* на ріст проростків також відображалось підвищенням параметрів флуоресценції хлорофілу та вмісту фотосинтетичного пігменту. Крім того, порівняно з неінокульованими обробками, інокуляція *T. viride* також підвищила вміст Pi у розсаді. Таким чином, *T. viride* є корисним грибом для синергічного поглинання Pi та росту рослини. Це дослідження закладає основу для рекомендації *T. viride* як біологічне добриво та зменшує забруднення навколишнього середовища хімічними добривами [22].

Представлено результати інокуляції насіння каноли (*Brassica napus* L.) штамом *Trichoderma viride*, який сприяє росту рослин. Сім морфологічно різних штамів *T. viride* (TvI-VII) виявились здатними синтезувати ауксини та виявляли целюлолітичну та пектинолітичну активність. Відзначено також позитивний вплив гриба на висоту та розгалуженість рослин, масу тисячі насінин [23].

Біопраймінг як нова техніка обробки насіння передбачає нанесення корисних мікроорганізмів на поверхню насіння для стимуляції проростання насіння, росту рослин і захисту насіння від патогенів, що передаються через ґрунт і насіння. Проведено дослідження проростання насіння, живості сходів та біохімічних ознак однієї з найважливіших овочевих культур (помідор, *Solanum lycopersicum* L.). Результати одного із досліджень показали, що біогрунтування насіння томатів корисними грибковими інокулянтами та С-РС було дуже ефективним. Найбільш оперативними біостимуляторами виявилися біопраймовані *T. viride* та *B. bassiana* порівняно з іншими біостимуляторами (*T. asperellum* та С-РС). Таким чином, щоб забезпечити стає сільське господарство, це дослідження пропонує нові можливості для застосування біопраймінгу як альтернативної та екологічної стратегії управління хімічної обробці та забезпечує цінну основу для покращення проростання насіння [24].

Хвороби кореневої гнилі поширені, можливо, частково через надмірне використання синтетичних добрив. Синтетичні добрива також можуть призвести до деградації ґрунту. *Trichoderma* широко використовується в біодобривах і біопестицидах. У дослідженні застосовувалося поєднання чотирьох видів *Trichoderma* (сполука агента *Trichoderma*, СТА) до *S. chinensis* та оцінка його впливу на ріст, а також на поживні речовини ґрунту в ризосфері, активність ферментів і структуру мікробного співтовариства. СТА збільшив розчинний білок, хлорофіл і індивідуальну вагу *S. chinensis*, тоді як комплексне добриво зменшило хлорофіл. СТА підвищив активність ґрунтових ферментів і рН у *S. chinensis* ризосферного ґрунту, тоді як комплексне добриво їх зменшило. СТА не виявив істотного впливу на поживні речовини ґрунту та органічну речовину, у той час як він зменшив кількість грибів та альфа-різноманітність грибів і бактерій і збільшив значення В/Ф, що покращило мікробну спільноту ризосфери. І СТА, і комплексне добриво значно змінили структуру мікробного співтовариства ґрунту. СТА покращив якість ґрунту завдяки збільшенню корисних

Ascomycota, *R. picketti* та зменшення шкідливих *Basidiomycota*, *I. mors-panacis* та *Corynebacterium sp.* Підсумовуючи, синтетичні добрива шкодять родючості ґрунту, і їх надмірне використання може бути пов'язане з появою кореневої гнилі. СТА може сприяти росту *C. chinensis*, покращувати ґрунт і зменшувати захворюваність та тяжкість *C. chinensis* хвороба кореневої гнилі, що дає можливість замінити синтетичні добрива, принаймні частково [25].

Вивчалася роль легких сполук, вироблених штамми грибів *Trichoderma*, у стимулюванні росту рослин та їхнє застосування для біологічного контролю. Десять ізольованих штамів ризосфери *Trichoderma* демонстрували антагоністичну дію та різні морфологічні особливості. Штами ризосфери *Trichoderma* були досліджені на їхні властивості стимулювання росту рослин [26].

Спільне внесення фосфорних добрив і *Trichoderma* може покращити якість плодів перцю за рахунок підвищення вмісту розчинних цукрів, розчинних білків, вітаміну С, капсантин і капсаїцин. Інтегруючи ці результати, визначили обробку TP85 (внесення 85% стандартної дози фосфорного добрива із сумішшю *Trichoderma*) як оптимальну стратегію внесення добрив. Ця комбінована стратегія є не лише корисною з точки зору підвищення якості та врожайності рослин перцю, але також може сприяти сталому розвитку здорового ґрунту та зменшенню витрат на вхідні ресурси, які несуть фермери [27].

Застосування *T. harzianum* у поєднанні з позакореневим внесенням цинку та заліза значно підвищили висоту рослин, довжину колоса, урожайність зерна, кількість насіння на колос та індекс урожаю, особливо при обробці Zn-9mM, Zn-18mM, Fe-9mM/*T.harzianum*/Zn-9mM і Fe-18mM. Фотосинтетичні пігменти, такі як хлорофіл а, хлорофіл b і загальний хлорофіл, також були покращені завдяки застосуванню мікроелементів у поєднанні з *T. harzianum*[28].

1.2.1.3. Контроль патогенів

Розвиток сучасних біотехнологічних підходів веде до збільшення можливостей використання антагоністів грибів проти широкого спектру хвороб рослин. Вейндлінг (1932, 1934) описав потенціал *Trichoderma lignorum* (*T. viride*) для боротьби з рослинно-патогенними грибами шляхом мікопаразитування та повідомив про перше використання відомого антагоніста, що продукує антимікотики, для боротьби з хворобами рослин. Пізніше Вейндлінг (1941) зазначив, що види *Trichoderma* виділяють антимікотик, який був токсичним для патогенів рослин, включаючи *Rhizoctonia solani* та *Sclerotinia americana*, і отримано назву гліотоксин. Це був перший запис про використання відомого антагоніста, що продукує антимікотики, для боротьби з хворобами рослин [29].

Загальні результати досліджень, проведених *in vitro* та *in vivo*, показали, що хворобу білої гнилі стебла арахісу можна значною мірою контролювати за допомогою антагоністичних грибів, які зустрічаються в природній флорі арахісу, включаючи *T. viride*, *A. flavus*, *P. rubens*. За результатами *T. viride*, *A. flavus* і *P. rubens* (MN395854.1) були найефективнішими ізолятами для придушення збудника та покращення показників росту як в умовах *in vitro*, так і в тепличних умовах. Після проведення випробувань у польових умовах у майбутніх дослідженнях це дослідження може стати перспективним у застосуванні ендofітних агентів як важливої частини інтегрованого лікування цього важкого захворювання [30].

Стосовно травоядних тварин рослинний симбіонт - *Trichoderma* зацікавлений у підтримці здоров'я свого рослинного хазяїна, тому праймінг, активований *Trichoderma*, не виключає впливу на комах. З цією метою *Trichoderma* розвинула здатність активувати реакції рослин: 1) посилюють регуляцію генів, залучених до реакцій окислювального вибуху, 2) викликають зміни в метаболомі, які призводять до фітосполук з репелентною, антипоживною та токсичною дією на травоядних тварин або негативно впливають на баланс кишкового протеому комах, і 3) посилюють

експресію генів, що кодують захисні ферменти. Як наслідок, деякі *Trichoderma* можуть, активуючи один або більше цих механізмів, посилити захист рослин від комах-шкідників, а також від переносників фітопатогенів (наприклад, віруси), такі як попелиця, трипси, білокрилки, жуків [31].

Більшість досліджень взаємодії *Trichoderma*–рослини проводилася в корневих системах. Однак не слід забувати, що багато штамів *Trichoderma* живуть і можуть бути виділені з надземних частин рослини, де вони ендofітно колонізують листя та стебла. Деякі штами *Trichoderma* ефективні в прямому контролі патогенів у філосфері, хоча їх механізм дії, здається, пов'язаний більше з індукованою резистентністю та мікопаразитизмом, ніж до прямої конкуренції. Вибрані штами *Trichoderma* також можуть вивільняти ЛОС, пов'язані зі стимулюванням росту рослин, але також може брати участь у зменшенні втрат енергії та індукції фотосинтезу та резистентності до листяних патогенів, таких як збудники борошнистої роси. Навіть ендofітні штами можуть пом'якшити негативний вплив мурашок-листорізів як у сільському господарстві, так і в лісівництві завдяки можливості діяти як охоронці своїх рослин-господарів, дозволяючи захист усієї рослини [32].

Агенти біоконтролю *T. viride* (T51) і *T. erinaceum* (T52) використовувалися для оцінки їхніх властивостей біоконтролю проти *S. sclerotiorum*. Результати показали, що обидва *T. viride* та *T. erinaceum* мають значний потенціал для протидії патогенній інфекції в тканинах господаря. Попередні звіти показують інгібіторну активність *T. viride* та *T. erinaceum* проти збудника *S. sclerotiorum*. Амір та ін. (2019) повідомили, що біологічна обробка насіння томатів *T. erinaceum* допомагає в транскрипційному перепрограмуванні генів, пов'язаних із захистом помідорів від фузаріозного в'янення. Інше дослідження показало, що *Trichoderma hamatum* 382 викликає системну стійкість до *Botrytis cinerea* у *Arabidopsis*, *Rhizoctonia solani* та *S. Sclerotiorum*. У багатьох дослідженнях *Trichoderma* spp виявляється опосередкований праймінг проти фітопатогенів та його вплив на ключових гравців захисту було добре продемонстровано. Саравана Кумар та інші

(2017) повідомили, що штам *T. harzianum* є потенційним агентом біозахисту проти *Fusarium graminearum* і індукує системну стійкість кукурудзи. Санчес-Монтесінос та інші (2019) повідомили про зниження частоти захворювань, спричинених *Pythium ultimum* [33].

Місцевий штам *Trichoderma harzianum* CE92 (Th-1) має хороший потенціал як агент біологічного контролю проти широкого спектру патогенних грибів деревної гнилі, які потенційно можуть заразити кілька видів міських дерев у Сінгапурі. Він має переваги швидкого росту та широкого спектру дії *in vitro* проти багатьох видів фітопатогенних грибів. Крім того, дослідження механізму показують, що його інгібуюча діяльність була опосередкована як викиданими леткими речовинами, так і прямим контактом з міцелієм [34].

Також досліджували вплив *Trichoderma hamatum* Th23 на рослини томатів як засіб захисту від вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ). Th23 може індукувати системну резистентність томатів до ВТМ, модулюючи реакцію рослини, запускаючи численні шляхи захисту рослин, підвищуючи резистентність і запобігаючи придушенню захисних генів. Попереднє застосування Th23 перед зараженням ВТМ значно підвищило висоту параметрів росту томатів, покращило загальний хлорофіл, зменшило тяжкість захворювання та зменшило накопичення ВТМ в інфікованих тканинах. Крім того, зниження рівня маркерів окисного стресу (MDA та H₂O₂) і підвищення антиоксидантних ферментів (SOD, CAT і PPO) також повідомлялося. Результати свідчать про потенціал застосування Th23 для боротьби з вірусними хворобами рослин [35].

Мікопаразитарний потенціал *T. brevicompactum* K26 був підтверджений в інфікованих рослинах, де спостерігалися важливі зміни в параметрах росту рослин. Загалом, можна визначити, що гени *nag1*, *tgf-1* та *tmk-1* можуть служити надійними маркерами для оцінки біологічно контрольованого агента *Trichoderma*. Також, *T. brevicompactum* K26 може бути розглянутий як перспективний кандидат для боротьби з *F. Culmorum*[36].

Комбінація метанольного фруктового екстракту *C. colocynthis* та *T. viride* зменшив фузаріоз значно краще, ніж одноразове застосування *C. colocynthis* або *T. viride*, поодиноці. Швидше за все це було наслідком індукованої активності захисного ферменту. Індукція резистентності, описана в дослідженні, є легкою та менш дорогою технікою для забезпечення максимального захисту в боротьбі з грибковими хворобами [37].

1.2.2. Використання грибів роду *Trichoderma* у сфері екології

Агенти біоконтролю, які застосовуються після фумігації, відіграють важливу роль у мікросередовищі ґрунту. Лабораторні та польові експерименти довели, що *Trichoderma*, застосована після фумігації, зменшує виникнення хвороб, що передаються через ґрунт, оптимізує мікросередовище ґрунту, сприяє росту огірків, підвищує стійкість огірків до хвороб, підвищує врожайність огірків. *Trichoderma*, застосована після фумігації, має перспективу застосування та допомагає запобігти хворобам, що передаються через ґрунт, зберегти здорове довкілля та сталий розвиток [38].

Незмірні викиди забруднюючих речовин, у тому числі пластику, азобарвників і особливо важких металів, промисловими підприємствами та заводами становлять небезпечну для життя небезпеку для навколишнього середовища. Є дослідження-доказ того, що забруднення навколишнього середовища, спричинене азобарвниками, можна потенційно зменшити за допомогою певних штамів грибів. Максимальна біодеградація барвників Synozol за *A. niger* та *T. viride* показав ефективність 90% і 87% відповідно. На негативну фітотоксичну дію оброблених грибами стічних вод свідчило проростання насіння квасолі мунг. Використання обох штамів грибів є сприятливим для очищення середовища, забрудненого токсичними забруднювачами, особливо азобарвниками [39].

1.2.3. Використання грибів роду *Trichoderma* у медицині

Результати свідчать про те, що очищена *T. viride* l-аспарагіназа може затримувати розвиток раку печінки та може бути використана як потенційний кандидат для майбутнього застосування в медицині як протипухлинний препарат [40]. Встановлено, що *T. polysporum* продукує ліпофільний циклоспорин А. Він володіє різноманітними біологічними і фізіологічними діями: антипаразитичною, фунгіцидною, протизапальною та імуносупресивною властивостями. Циклоспорин А використовується в якості імуносупресорів після трансплантації органів і при лікуванні деяких аутоімунних порушень, таких, як псоріаз, atopічний дерматит, хвороба Бесета [41].

1.2.4. Використання грибів роду *Trichoderma* у синтезі наночастинок

Грибкова нанотехнологія або міконанотехнологія — це нове слово, яке спочатку було введено в 2009 році. Це виробництво та подальше використання наночастинок через різноманітні гриби, особливо в біомедичних, екологічних і сільськогосподарських цілях. Наука досліджує численні синтези металевих наночастинок: технології обробки, збереження навколишнього середовища та перспективи майбутнього.

Наночастинки, опосередковані грибами, ефективно використовуються в широкому діапазоні наукових галузей, включаючи медицину, фармацевтику, сільське господарство та електроніку. У результаті деякі оцінки були зосереджені на застосуванні мікогенних наночастинок проти хвороб рослин, антибіотиків після збирання врожаю, боротьби з мікотоксинами та шкідниками рослин, а також деяких патогенів тварин. Крім того, грибкові наноматеріали мають високий потенціал і перспективи для покращеної діагностики, біосенсорів, точного землеробства та цільових розумних систем доставки [42].

Рослинництво незмінно передбачає масове використання хімічних пестицидів, інсектицидів і гербіцидів, які демонструють біоаккопичення токсичних хімічних залишків, потенційно небезпечних для рослинних екосистем. Ця проблема перемістила фокус досліджень на пошук більш ефективних альтернатив, таких як агрохімікати на основі нанотехнологій. Втручання нанотехнологій в агропродовольчу галузь розширюється, щоб отримати переваги застосування нанотехнологій в електронній, фармацевтичній, біомедичній, лакофарбовій та косметичній промисловості. Однак хімічно синтезовані наночастинки мають високу вартість і значну екотоксичність [43].

Різні види грибів можуть створювати мікогенні наночастинки, які можуть стимулювати ріст і захищати культури від хвороб у деяких перспективних сільськогосподарських цілях завдяки антиоксидантним, антимікробним і стимулюючим рослинам властивостям [44].

Використовуючи агенти біоконтролю *Trichoderma* та *Hypocrea*, маємо екологічно чистий і швидкий метод синтезу наночастинок, який потенційно може подолати хімічні і фізичні методи синтезу, які є значно дорожчими, створюють небезпечні продукти, поширюють різноманітні хімічні речовини у навколишнє середовище шляхом використання високої температури та тиску. Серед мікробних агентів різноманіття внутрішньо- та позаклітинних білків і ферментів, які функціонують як відновники, робить грибові біоагенти більш придатними, ніж бактерії. Останнім часом використання агрохімікатів з наноструктурованими матеріалами стало актуальним. Декілька видів *Trichoderma* використовуються в нанотехнологіях, зокрема для синтезу металевих наночастинок (рис.1) [45].

У літературі, опублікованої з 2008 по 2021 роки, понад 100 наукових статей, опублікованих у затверджених журналах, згадується *Trichoderma* для синтезу наночастинок з різних металів [46].

Наночастинки срібла

Перший звіт про біосинтез наночастинок срібла з регульованими властивостями з непатогенного та економічно життєздатного агента біоконтролю передбачав інкубацію безклітинного фільтрату *T. asperellum* протягом 5 днів при 25 °С, що містить AgNO₃ (1 мМ). Використання УФ-видової спектроскопії виявило кінетику реакції з сильною смугою поверхневого плазмонного резонансу, що спостерігається при 410 нм, що вказує на синтез наночастинок срібла.

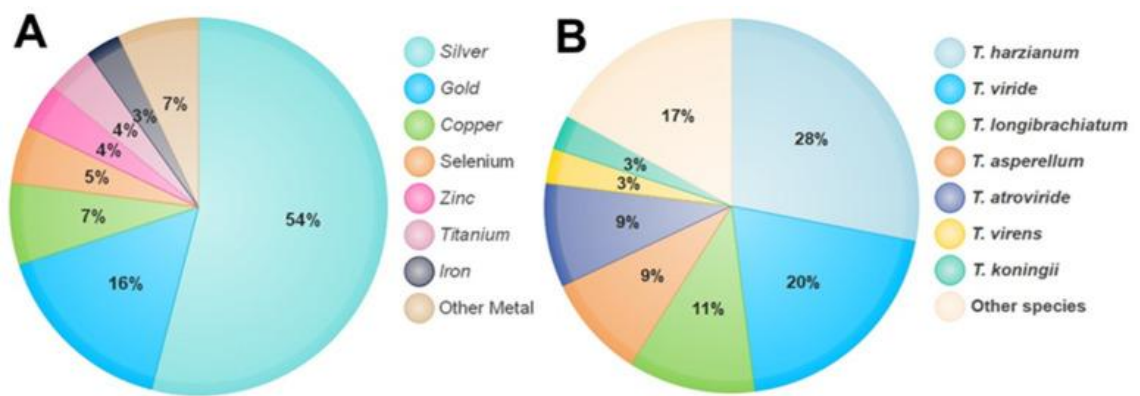


Рис. 1 – А - відсоток металів, використаних у синтезі наночастинок видами *Trichoderma*; Б - відсоток видів *Trichoderma*, які використовуються для синтезу наночастинок [45].

Розмір наночастинок срібла, за результатами TEM та XRD досліджень, становив від 13 до 18 нм. Ці наночастинок виявилися дуже стабільними навіть після тривалого зберігання. Через 6 місяців вони не виявляли значної агрегації [47].

T. reesei вперше було використано для позаклітинного біосинтезу AgNPs, що дозволяє синтезувати наночастинок Ag у промислових масштабах. AgNP, обмежені біомолекулами, продемонстрували антибактеріальну активність щодо *E. coli*. Випробування не показали суттєвої різниці між AgNP, синтезованими в статичних умовах, і синтезованими в умовах перемішування зі швидкістю 150 об/хв [48]. ПЕМ-зображення

показали морфологічно різноманітні форми та кристалічну природу AgNP з діаметром від 5 до 50 нм. Подібним чином інше дослідження показало, що вид *T. virens* був найефективнішим продуцентом AgNP у порівнянні із загальною 75 ізолятами з п'яти різних видів *Trichoderma*[49].

Клітинний фільтрат *T. harzianum* використовувався для синтезу AgNP простим екологічно чистим способом, без потреби в будь-яких токсичних відновниках, блокуючих агентах або дисперсійних агентах. Ельгорбан та інші вивчали синтез біогенних наночастинок срібла при кімнатній температурі в темряві за допомогою гриба *T. viride*. Центрифугування використовувалося для збільшення концентрації AgNPs. Біоредукцію наночастинок срібла (AgNP) спостерігали спектрофотометрично, а AgNP, що досліджувалися, характеризували за допомогою УФ-вида, TEM та SEM. Утворені наночастинок були стабільними та полідисперсними глобулярними частинками з діаметром від 1 до 50 нм [50].

У порівнянні з наночастинками срібла, стабілізованими цитратом, біосинтезовані наночастинок срібла, покриті антимікробними метаболітами *T. viride* були сильнішими, ніж їхні хімічні аналоги, у знищенні патогенних бактерій. Ці результати чітко продемонстрували одночасну синергетичну активність вторинних метаболітів і білків *T. viride* з наночастинками срібла у посиленні антибактеріальної активності. Є дослідження, у яких продемонстровано протигрибкову дію широкого спектру для біогенних наночастинок срібла (BSNP), синтезованих із безклітинного фільтрату *T. viride* (MTCC 5661). Порівняно з хімічно синтезованими наночастинками срібла (CSNP) подібної форми та розміру протигрибкова активність була вищою в частинках BSNP порівняно з CSNP; BSNP також посилили пригнічення росту міцелію та зменшення ваги грибових патогенів *F. oxysporum* та *Alternaria brassicicola* на 20–48,8%. Ці результати дають нам зрозуміти роль антимікробних метаболітів, які виробляє *Trichoderma viride*, у покритті BSNP для посилення їхніх антимікробних властивостей проти збудника хвороби рослин [51].

Наночастинки оксиду цинку

Спільне культивування може стимулювати виробництво нових вторинних метаболітів ефективніше, ніж монокультури. Інше дослідження біосинтезу ZnONP показало утворення наночастинок із кристалічною структурою, вільною від домішок, згідно з аналізом PXRD. Розмір кристалічних частинок коливався від 12 до 35 нм. Ці біосинтезовані ZnONP показали антибактеріальну ефективність проти рисової причини бактеріального опіку листя, *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* [52].

T. harzianum використовується як стабілізатор для зеленого синтезу біогенних ZnONP з відносно малим розміром 8–23 нм. Їхня протигрибкова активність проти патогенів, що передаються через ґрунт, таких як *R. solani* (RS9), *Fusarium* sp. (F10) та *M. phaseolina* (M4) були продемонстровані *in vitro* та в тепличних умовах. Трихогенні опосередковані ZnONP пригнічували розвиток гіф у трьох саджанців бавовнику, що вказує на їхню ефективність проти грибкових інфекцій. Як наслідок вищезазначеного можна зробити висновок, що мікроміцети *T. harzianum* виробляють різноманітні білки та ферменти, усуваючи потребу в хімічних відновниках і стабілізаторах [53].

Наночастинки міді

Безклітинний екстракт *T. asperellum* був використаний для створення наночастинок оксиду міді (TA-CuONP). Виявлено, що наночастинки TA-CuO є кристалічними сферичними частинками. Консоло та інші вперше виявили численний позаклітинний біосинтез наночастинок з *T. harzianum*, а також синтез CuO та ZnONP з цього гриба. Засоби біоконтролю *Pseudomonas fluorescens*, *T. atroviride* та *Streptomyces griseus* були використані у виробництві наночастинок міді та кремнезему. Було перевірено антибактеріальні властивості CuNP проти двох бактерій, *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli*, використовуючи простий екологічно чистий метод [62]. Для аналізу кремнезему та наночастинок міді використовували спектрометрію УФ-вид, TEM та аналіз EDAX. Було виявлено, що наночастинки агреговані та мають неправильну сферичну форму. Розмір

наночастинок кремнезему коливався від 12 до 22 нм, тоді як розмір наночастинок міді коливався від 5 до 25 нм [54].

Наночастинки золота

Синтез наночастинок золота можливий за допомогою *Trichoderma viride* та *Hypocrea lixii*. Вони мають здатність стимулювати ріст рослин і контролювати патогенні мікроорганізми рослин, що слугує як ефективним біокаталізатором і потужним антимікробним агентом. Біомолекули, присутні в безклітинних екстрактах обох грибів, були здатні синтезувати та стабілізувати утворені частинки. Процедура синтезу була дуже швидкою та екологічно чистою, що не вимагало подальшої обробки. Біосинтезовані наночастинки слугували ефективним біокаталізатором, який відновлював 4-нітрофенол до 4-амінофенолу в присутності NaBH [55].

Наночастинки селену

Серед цікавих металів селен (Se) і його застосування в біомедицині, сільському господарстві та охороні навколишнього середовища викликали великий дослідницький інтерес в останні десятиліття. *Trichoderma* використовується для утворення нанопродуктів металевим селеном завдяки його здатності відновлювати селеніт і перетворювати його на менш токсичні похідні.

Наночастинки селену (SeNP) набувають все більшого значення в галузі медицини завдяки своїм антибактеріальним і протипухлинним властивостям. SeNP є біосумісними та нетоксичними порівняно з аналогами, селенітом (SeO₃ (-2)) і селенатом (SeO₄ (-2)). Вони можуть бути синтезовані фізичними, хімічними та біологічними методами і мають чіткий яскраво-оранжево-червоний колір. Біогенні SeNP є стабільними та не агрегують завдяки природному покриттю біомолекул.

SeNP діють як потужні хіміопротективні та хіміотерапевтичні засоби. Кон'югація з антибіотиками підвищує їх протиракову ефективність. Вони також знаходять застосування в нанобіосенсорах і оздоровленні навколишнього середовища [56].

Спостерігали вплив SeNP, як біостимуляторів рослин, на різні стадії росту рослин *Vigna radiata*. Окрім покращення росту та захисту рослин від фітопатогенів, було виявлено, що SeNP набагато менш токсичні, ніж селеніт в тестованому насінні. Інокульовані рослини біосинтезованими SeNP з *T. atroviride* продемонстрували значний рівень захисту 72,9% проти фітофторозу томатів, викликаного *P. infestans*, де зазначені захисні реакції включали накопичення лігніну, калози та перекису водню, які підтримували клітинний захисний механізм, тоді як біохімічний захисний механізм співпрацював, підвищуючи рівні ліпоксигенази (LOX), фенілаланінліаза (PAL), β -1,3-глюканаза (GLU), супероксиддисмутаза (SOD) у рослин [57].

1.2.5. Використання грибів роду *Trichoderma* у тваринництві

Продуктивність дрібних жуйних в Ефіопії низька через дефіцит кормів протягом року, як з точки зору якості, так і кількості. Ця проблема призводить до використання місцевих побічних продуктів лігноцелюлози, які містять високий вміст целюлози, геміцелюлози та лігніну. Відомо, що поживну цінність цих лігноцелюлозних побічних продуктів можна покращити за допомогою біологічної, хімічної або комбінації обох методів[58].

Результати дослідження вказують на те, що дієти, якими годували овець, що містили оброблену чи необроблену рисову лушпиння, показали хороші результати щодо споживання корму. Є видима засвоюваність, зміни живої ваги та економічної ефективності порівняно з необробленим жомом цукрової тростини. Згодовування біологічно обробленого жому цукрової тростини ефективними мікроорганізмами та *Trichoderma viride* покращило продуктивність росту та економічну ефективність порівняно з необробленим жомом цукрової тростини. Гематологічні показники крові та метаболіти також були виявлені в нормальному фізіологічному діапазоні здорових овець. Отже, можна зробити висновок, що обидва корми *Trichoderma viride* і ефективні мікроорганізми можуть бути включені в раціон жуйних. Однак для

визначення оптимального рівня вмісту для досягнення максимальної продуктивності необхідно провести додаткові дослідження жому цукрової тростини [59].

1.2.6. Гриби роду *Trichoderma* – продуценти ферментів

Ферментативні реакції та біотрансформації, що каталізуються грибковими ферментами, використовуються в промисловості, сільському господарстві, харчових технологіях і медицині та надзвичайно зросли в останні роки. Було докладено багато зусиль, щоб виявити нові джерела ферментів і адаптувати ці біологічні каталізатори. Важливість біокаталітичних реакцій та біотрансформацій за допомогою грибкових ферментів надзвичайно зросла в різних галузях. Ендоглюканазу, отриману з *Trichoderma viride*, використовували для біоконверсії сільськогосподарських відходів - пшеничну солому (WS) і кукурудзяну солому (CS) використовували як біомасу для отримання лимонної кислоти та одноклітинного білка [60].

1.2.7. Метаболіти грибів роду *Trichoderma*

Терпеноїди - важливий клас рослинних і мікробних вторинних метаболітів, які не лише володіють різнобічною фармакологічною дією, але також мають великий потенціал у сільськогосподарській, харчовій, косметичній промисловості та навіть як замітник певного викопного палива. Дослідження нових і стійких ресурсів для біосинтезу терпеноїдів є життєво важливим для відкриття та індустріалізації біотехнологічного виробництва цінних терпеноїдів. Сьогодні передова метаболічна інженерія та синтетична біологія роблять мікроорганізми ефективними платформами для екологічного промислового виробництва природних сполук високої цінності.

Терпеноїди є найпоширенішими вторинними метаболітами *Trichoderma*, зібраними з багатьох активованих форм ізопренової одиниці та наділеними великою структурною різноманітністю. До цього часу було

виявлено та ідентифіковано 253 терпеноїди грибів *Trichoderma*, включаючи 202 сесквітерпени, 48 дитерпенів, 2 монотерпени та 1 меротерпеноїд.

Фармакологічні дії. Загалом, фармакологічні дослідження терпенів *Trichoderma* головним чином зосереджувалися на їхній антибактеріальній активності, протигрибковій активності, інгібіторній активності щодо видів морського планктону, цитотоксичній активності та антивірусній активності.

Антибактеріальна дія. Загальновідомо, що *Trichoderma* — це рід грибів, який має здатність антагонізувати різноманітні патогени рослин і все більше досліджень повідомляють про антибактеріальну дію терпеноїдів *Trichoderma*.

Протигрибкова дія. Види *Trichoderma* та велика кількість терпеноїдів, які вони виробляють, також добре відомі своєю протигрибковою дією проти грибів, патогенних для людини та рослин. САФ-603 продемонстрував широкий протигрибковий спектр проти різних грибів (*Candida albicans*, *C. krusei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium italicum*, *C. musae*, *Colletotricium gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*). Ефективність терпеноїдів *Trichoderma* проти грибів, патогенних як для людини, так і для рослин, передбачає й потенційне використання їх як потенційних протигрибкових препаратів і агрохімікатів.

Антивірусна дія. Гарціанові кислоти А і В, два циклобутен- містить сесквітерпени, демонструє багатообіцяючу дію проти ВГС і низьку токсичність завдяки зниженню рівня РНК ВГС і, можливо, блокуванню етапу входу в життєвий цикл ВГС шляхом націлювання на вірусні Е1/Е2 і білки CD81 клітини-господаря. Крім того, А і В були двома нові антивірусні дитерпени, які показали потужну активність проти вірусу грипу проти Н1N1 зі значеннями IC50 0,07 і 5,0 мкг/мл, таким чином забезпечуючи нову основу для розробки антивірусних препаратів.

З усього, що обговорювалося вище, неважко зробити висновок, що види *Trichoderma* можна вважати чудовим природним джерелом для біосинтезу терпеноїдів. Пошук високоцінних терпеноїдів і розуміння шляхів їхнього біосинтезу зі складною регуляцією мають вирішальне значення для

ефективного використання видів *Trichoderma*. Отже, інтегруючи метаболічну інженерію, синтетичну біологію, генну інженерію та інші сприятливі технології, буде досягнуто значно більшого прогресу у відкритті більшої кількості біоактивних терпеноїдів зі структурними та функціональними різноманітностями та розкриття точних механізмів *Trichoderma* біосинтез терпеноїдів [61].

Досліджували *in vitro* потенціал *Trichoderma harzianum* виробляти біоактивні вторинні метаболіти, які можна використовувати як альтернативу синтетичним сполукам. Дослідження було зосереджено на аналізі двох екстрактів *T. harzianum* з використанням розчинників етилацетату та *n*-бутанолу різної полярності. Екстракти досліджували за допомогою фітохімічного аналізу для визначення вмісту поліфенолів, флавоноїдів, дубильних речовин і алкалоїдів. Тонкошарова хроматографія (ТСХ) і газова хромато-мас-спектроскопія (ГХ-МС) були використані для аналізу летючих органічних метаболітів (ЛОС), присутніх в екстрактах. Для вимірювання антиоксидантної активності використовували 1,1-дифеніл-2-пікрилгідразил (DPPH) тест. Було показано, що *Trichoderma harzianum* має значно високий вміст дубильних речовин і алкалоїдів із помітною різницею між двома екстрактами. Аналіз GC-MS виявив 33 потенційні сполуки з численними перевагами, які можна використовувати в сільському господарстві та медичній промисловості. Крім того, була виявлена сильна протигрибкова активність проти *Sclerotinia sclerotiorum* на 94,44%, *Alternaria sp.* на 77,04%, а *Fusarium solani* на 51,48; так само, IC₅₀ антиоксидантної активності було оцінено для екстракту етилацетату на 71,47% і *n*-бутанолового екстракту на 56,01%. Це призводить до висновку, що ЛОС *Trichoderma harzianum* відіграють значну роль як протигрибковий та антиоксидантний агент, беручи до уваги корисні біологічно активні хімічні речовини, зазначені в екстрактах [62].

Екстракти, отримані з виду *Trichoderma*, пригнічують ріст *in vitro* *M. perniciosus* краще ніж *M. roreri*. Екстракт *T. spirale* (C10) продемонстрував

максимальний ефект інгібування при 10 мкг/мл, тоді як *T. reesei* (C2A) і *T. harzianum* (C4A) спостерігався надмірний ріст при вищих концентраціях. Виявлено відмінності в групах вторинних метаболітів і профілях метаболітів, які залежали від виду *Trichoderma*. Інгібіторну активність можна пояснити виявленими протигрибковими сполуками, такими як віддрол, β -каріофілен, тирозол, бутил ізобутират, сорбінова кислота, пальмітинова кислота, пальмітелаїдова кислота, лінолева кислота та олеїнова кислота. Ці знахідки свідчать про те, що ці екстракти можна використовувати для розробки перспективних агентів біоконтролю проти хвороби відьомської мітли, особливо екстракту *T. spirale* (C10). Однак для повної характеристики біоактивності, виявленої екстрактами, потрібні подальші хімічні та антагоністичні дослідження [63].

У великому масштабі галова кислота (ГК) утворюється таназою, глікопротеїновою естеразою, що розщеплює дубильну кислоту. Танназа з мікробних джерел була запропонована для розкладання природних дубильних речовин протягом останніх трьох десятиліть. Біоконверсія таніну за допомогою мікробної таннази може ефективно виробляти значні кількості ГКб. Виробництво ГЕ та таннази пов'язані, оскільки танназа каталізує деполімеризацію гідролізованих танінів, що призводить до вивільнення ГК. Спільне культивування грибів відіграє важливу роль у підвищенні активності цінних ферментів, таких як целюлаза, лакказ, пектиназа, танназа тощо, а також у покращенні виходу основних продуктів, таких як галова, ботулінова та олеанолова кислоти. Танназа із спільного культивування *Penicillium chrysogenum* + *Trichoderma viride* була використовується для гідролізу дубильної кислоти для виробництва галової кислоти (84 ± 2 U/г/хв), використовуючи виноградну шкірку як субстрат.

Цей метаболіт виявляє низку біоактивності, зокрема антиоксидантну, протимікробну, протизапальну, антиульцерогенну та протиракову. Нещодавно було опубліковано деякі дослідження, які пов'язують вплив ГК перед утворенням амілоїдних бляшок, які вважаються початковим етапом

хвороби Альцгеймера. Крім лікувальних аспектів, ГК застосовується і в інших сферах. Його перше застосування було у шкіряній промисловості як хелатуючий агент. Перші фотографії використовували ГК як проявник. Галова кислота використовується для синтезу триметоприму, протимікробного засобу, а також як консервант у харчових продуктах і напоях, головним чином через його здатність викрадати вільні радикали [64].

1.3. Особливості культивування *Trichoderma*

Гриби роду *Trichoderma* є цінним об'єктом біотехнології завдяки широкому спектру можливих застосувань, зокрема, на їх основі перспективним є отримання багатоцільових біопрепаратів для рослинництва. Із-за високої видо- і штамоспецифічності грибів роду *Trichoderma* вибір культури, корекція та оптимізація живильних середовищ, а також фізико-хімічні умови середовища є ключовими аспектами досліджень для подальшого ефективного використання в складі біопрепаратів.

Культивування грибів може проводитися двома способами: глибинним або поверхневим. При культивуванні поверхневим способом гриби вирощують на поверхні щільного, сипкого середовища або тонкому шарі рідкого середовища, при цьому мікроорганізми отримують кисень безпосередньо з газової повітряної фази. При підборі живильного середовища для поверхневого твердофазного культивування намагаються використати комплексні натуральні живильні середовища, що мають у своєму складі як джерело вуглецю, так і джерело азоту.

Вуглець є одним із основних елементів для росту та розвитку всіх живих організмів і грибів у тому числі. При використанні глюкози, фруктози, сахарози або крохмалю спостерігається висока швидкість росту культури у порівнянні з целюлозою чи лактозою. Потрібно відмітити, що при виборі джерела вуглецю необхідно враховувати штамоспецифічність даного гриба. D-фруктоза, D-манноза, D-галактоза, D-ксилоза, декстрин краще

засвоюються у більшості вивчених видів, але зустрічаються випадки, коли сахароза і гліцерин засвоюються краще.

Як джерело азоту серед органічних речовин можна виділити L-аланін, L-аспарагінову кислоту, L-глутамінову кислоту, а щодо неорганічних – нітрат натрію, нітрат калію, нітрат та сульфат амонію. Відзначено найкраще зростання мікроміцетів на середовищах, що містять нітрат та сульфат амонію.

Важливими фізико-хімічними факторами середовища для накопичення максимальної кількості біомаси є кислотність середовища, температура та аерація. Максимальне зростання грибів спостерігається при рН в межах від 3,7 до 4,7. Для різних видів *Trichoderma* оптимальна температура росту відрізняється і лежить у межах від 22 до 34 °С. Гриби роду *Trichoderma* є аеробами, тому особливо важливий режим аерації. Оптимальна швидкість перемішування становить 150 об/хв.

Освітлення синього кольору та ближнього ультрафіолету, мінеральні елементи живлення (йони кальцію) та співвідношення вуглецю та азоту в складі живильного середовища (C:N = 160:1) сприяють індукції процесу спороутворення грибів [65].

Таким чином, мікроміцети роду *Trichoderma* – цінний об'єкт біотехнологій завдяки різноплановим застосуванням у народному господарстві, зокрема як засобів біоконтролю та покращення живлення рослин. Під час розробки технології глибинного культивування цих грибів треба враховувати високу штамоспецифічність представників цього роду відносно джерел вуглецю та фізико-хімічних факторів середовища.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Роботу виконано на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара.

Об'єктом дослідження був вихід біомаси *Trichoderma viride* КМВ-F-15 залежно від складу поживного середовища та фунгістатична активність фільтрату культуральної рідини гриба по відношенню до фітопатогенного гриба *Fusarium culmorum*.

В роботі використовувався штам *Trichoderma viride* КМВ-F-15, виділений із чорнозему звичайного, що зберігається в колекції культур мікроорганізмів кафедри та штам фітопатогенного грибу *Fusariumculmorum* ІМВ-F-50716 із колекції культурмікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного.

Для визначення впливу різних джерел вуглецю на ріст та антагоністичну активність *T. viride* КМВ-F-15 використовували сахарозу, глюкозу, фруктозу, мальтозу, гліцерин, зелену патоку та кукурудзяний екстракт.

Для визначення впливу різних джерел азоту на ріст та антагоністичну активність *T. viride* КМВ-F-15 використовували: складні органічні джерела азоту (автолізат дріжджів та кукурудзяний екстракт), натрій азотнокислий, калій азотнокислий, амоній сірчаноокислий, амоній хлористий, амоній азотнокислий, L-глутамінову кислоту, аргінін солянокислий у концентрації 0,5 %.

Обрані азот- та вуглецьвмісні сполуки були введені в базове рідке середовище Чапека, де сахароза і натрій азотнокислий були замінені різними вуглець- та азотовмісними речовинами. Контрольним середовищем слугувало рідке середовище Чапека з сахарозою та натрієм азотнокислим.

Для проведення оптимізації поживного середовища для подальшого культивування за основу було взяте середовище (г/л): гліцерин – 20; NH_4Cl – 3; K_2HPO_4 – 1,3; KCl – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01, яке

виконувало роль середнього рівня. Оптимізацію поживного середовища проводили за трьома факторами: гліцерином – x_1 , NH_4Cl – x_2 , K_2HPO_4 – x_3 , інші компоненти підтримували на сталому рівні.

Засів здійснювали суспензією конідій гриба, вирощеного на агаризованому середовищі Чапека упродовж 7 діб. Концентрація конідій в інокуляті складала $2,5 \times 10^7$ в 1 мл, яку визначали підрахунком у камері Горяєва. У цукрові пробірки, де містилося 10 мл поживного середовища, вносили 0,2 мл інокулята. Вирощували на мікробіологічній качалці (200 об/хв) при 25-26°C упродовж 72 годин.

Оптимізацію складу поживного середовища проводили в 2 етапи.

Перший – постановка дослідів за планом повного факторного експерименту (ПФЕ). Другий етап – оптимізація середовища за методом «крутого сходження» [66, 67].

2.1. Повний факторний експеримент

Повний факторний експеримент виконують з метою побудови математичної регресійної залежності, що об'єднує різноманітні фактори з параметром, який необхідно визначити. Цей параметр називають функцією мети. Фактори – це параметри, які впливають на суттєве змінення функції мети.

У даній роботі потрібно визначити кількісний склад поживного середовища для культивування продуцента, яке буде давати максимальний вихід біомаси. Тобто перш за все необхідно провести аналіз факторів, що впливають на накопичення біомаси, тобто компонентів середовища – джерела вуглецю, нітрогену, фосфору. Далі скласти план експерименту й ставити досліди у відповідності до створеного плану. Шляхом статистичної обробки результатів експериментів побудувати регресійне рівняння, що буде пов'язувати всі перелічені фактори. Модулі коефіцієнтів, розрахованих за результатами експерименту, будуть вказувати на силу впливу факторів, а

знак при коефіцієнтах – на позитивний або негативний вплив на параметр оптимізації.

Кожен процес у системі може бути охарактеризований деякою залежністю параметра оптимізації від факторів ($x_1, x_2, x_3 \dots x_n$), що діють у системі. Тому вивчення будь-якої системи можна представити як дослідження функції багатьох змінних, тобто відшукування залежності виду

$$y = f(x_1, x_2, x_3 \dots x_n)$$

Це рівняння називають функцією відгуку. Воно описує деяку гіперповерхню в « $n+1$ » - мірному просторі (« $n+1$ » - число факторів). Отже, вивчення багатофакторної системи можна уявити як дослідження форми цієї поверхні, що зветься поверхнею відгуку. Простір, у якому будується поверхня відгуку, називають факторним простором.

Планування, проведення та обробка результатів ПФЕ складається з таких етапів:

- вибір залежних і незалежних змінних (факторів);
- кодування незалежних (вхідних) чинників;
- складання план-матриці експерименту;
- реалізація плану експерименту;
- розрахунок і оцінка значимості коефіцієнтів моделі;
- перевірка адекватності отриманої моделі.

Статистична обробка результатів дослідів ПФЕ проводиться за наступним алгоритмом. Спочатку для кожної серії паралельних дослідів (крім контрольного 9 варіанту) обчислюється середнє арифметичне значення функції відгуку за формулою:

$$\bar{Y}_j = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^k Y_{j,i}$$

де j – номер серії паралельних дослідів; k – число паралельних дослідів, проведених за однакових умов; $Y_{j,i}$ – поточне значення параметра оптимізації i -го дослідів j -ї серії.

Також для кожної серії паралельних дослідів обчислюється оцінка дисперсії s_j^2 за формулою:

$$s_j^2 = \frac{1}{k-1} \sum (Y_{j,i} - \bar{Y}_j)^2$$

Необхідно знайти розрахункове значення критерію Кохрена G_p - це відношення максимальної оцінки дисперсії до суми всіх дисперсій. Формула має наступний вигляд:

$$G_p = \frac{\max s_j^2}{\sum_{j=1}^N s_j^2}$$

Отримане значення порівнюють з табличним значенням критерію Кохрена при відомих значеннях загальної кількості дисперсій N і числом ступенів свободи f , пов'язаних з кожною з них як $f = k-1$.

Якщо виконується умова $G_p \leq G_{\text{табл}}$, то досліді вважаються відтворюваними, а оцінки дисперсій – однорідними. Оцінки однорідних дисперсій можна усереднити і знайти величину, звану оцінкою дисперсії відтворюваності

$$s_{\bar{Y}}^2 = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N s_j^2$$

з пов'язано число ступеней свободи

$$f = N(k-1)$$

Оцінку дисперсії середнього значення розраховують за формулою:

$$s_{\bar{Y}}^2 = \frac{s_y^2}{k}$$

з пов'язано число ступеней свободи

$$f = N(k-1)$$

Розрахунок коефіцієнтів рівняння регресії ведеться за формулами:

$$b_0 = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N Y_j$$

$$b_i = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{ij} y_i$$

де Y_j – вихід процесу (середнє арифметичне трьох дослідів), x_{ij} – значення змінної у відповідному стовпці (зі знаком «+», якщо верхній рівень, і зі знаком «-», якщо нижній рівень).

Іншими словами, для визначення коефіцієнта регресії при кожному лінійному члені підсумовують результати дослідів Y_j з урахуванням знаків відповідних факторів в матриці планування і отриману суму ділять на кількість випробуваних середовищ. Результати нульового (середнього) рівня не враховують.

Для визначення коефіцієнтів взаємодій $b_{1,2}$, $b_{1,3}$, $b_{2,3}$, $b_{1,2,3}$ зручно використовувати розширену матрицю, що враховує ефект подвійної і потрійної взаємодії (таблиця 2.1).

Оцінка значущості коефіцієнтів рівняння регресії проводиться за умовою:

$$|b| \geq s_b t$$

де b – коефіцієнт рівняння регресії; t – критерій Стюдента при 5 % рівні значущості, який знаходять у таблиці, число ступенів свободи $f = N(k-1)$;

s_b – оцінка коефіцієнта рівняння регресії, що визначається за формулою:

$$s_b = \sqrt{\frac{S_Y^2}{N}}$$

Таблиця 2.1

Розширена матриця планування ПФЕ-2³

№ дослідів	x_0	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3	$x_1x_2x_3$
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1

7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1	1

Оцінку дисперсії адекватності обчислюється за формулою:

$$s_{ад}^2 = \frac{1}{N - B} \sum (Y_j^e - Y_j^p)^2$$

де N – число дослідів повного факторного експерименту;

B – число коефіцієнтів регресії рівняння, включаючи вільний член;

Y_j^e, Y_j^p – експериментальне та розрахункове значення функції відгуку в j -тому досліді;

З дисперсією адекватності пов'язане число ступенів свободи:

$$f = N - B$$

Критерій Фішера розраховується наступним чином: порівнюються дисперсія відтворюваності з дисперсією адекватності і ділиться більше значення на менше. Розрахункове значення критерію Фішера отримується з таблиці значень. Рівняння регресії вважається адекватним, якщо виконується наступна умова: $F_p \leq F_{табл}$.

2.2. Метод крутого сходження

Метод крутого сходження (метод Бокса – Вілсона) – визначення такого поєднання факторів x_1, x_2, \dots, x_n , у якому досягається максимальне (мінімальне) значення вихідного параметра y . У методі крутого сходження крокова зміна факторів здійснюється у напрямку якнайшвидшого зростання (або зменшення) вихідного параметра (тобто за градієнтом).

2.3. Ваговий метод визначення виходу біомаси

Вплив складу поживного середовища на ріст триходерми оцінювали за виходом сухої біомаси ваговим методом. Утворену після культивування біомасу пропускали через паперові фільтри, доведені до постійної ваги і зважені. Біомасу на фільтрах висушували і фільтри знову зважували. Визначення ваги сухої біомаси клітин проводили на аналітичних вагах [68].

2.4. Метод агарових блоків для визначення фунгістатичної активності

Фунгістатичну активність фільтрату культуральної рідини *T. viride* вирощеної на оптимізованому середовищі визначали методом агарових блоків у модифікації М. В. Соколової та Г. В. Калько [69]. У розплавлене поживне агаризоване середовище Чапека вносили 5% від об'єму фільтрату культуральної рідини триходерми та розливали у чашки Петрі. Після застигання середовища у центр чашки поміщали блоки з міцелієм фітопатогенного гриба *Fusarium culmorum* IMB-F-50716. Контролем слугувало середовище без фільтрату. Визначали діаметр колонії фітопатогенного гриба на 6 добу інкубації в дослідних та контрольному зразках. Розраховували відсоток інгібування росту гриба за формулою:

$$\frac{(D_k - D_d)}{D_k} \times 100,$$

де D_d – діаметр колонії гриба в дослідних зразках, мм;

D_k – діаметр колонії гриба в контрольному зразку, мм.

Усі досліді були виконані у 3 повторностях. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Excel 2016 та Statgraphics Centurion XV version 15.01.02. Визначали середнє арифметичне та помилку середнього арифметичного. Відмінності між середніми були перевірені за допомогою множинного критерію Тьюкі. Всі відмінності вважали статистично значущими за $P < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В роботі було використано штам *Trichoderma viride* КМВ-F-15 із колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ДНУ імені Олеся Гончара, виділений із чорнозему звичайного і попередньо ідентифікованого співробітниками кафедри. *Trichoderma viride* КМВ-F-15 на щільному середовищі утворює колонії зеленого кольору (Рис. 3.1).

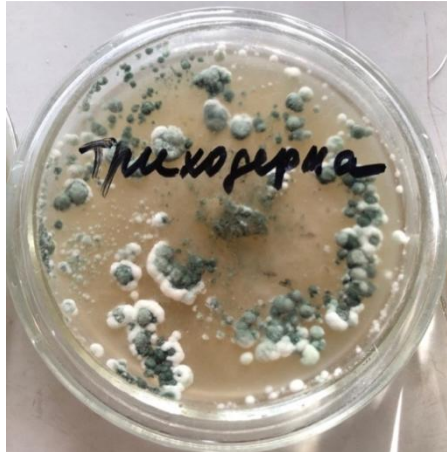
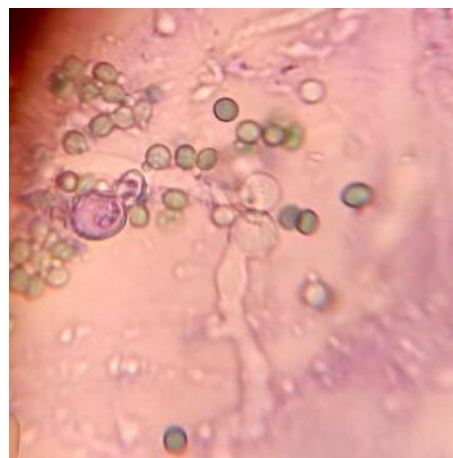


Рис. 3.1 Колонії *Trichoderma viride* КМВ-F-15

При мікроскопічному дослідженні препаратів-відбитків *Trichoderma viride* КМВ-F-15 можна спостерігати конідії, що мають забарвлення від блакитно-зеленого до темно-зеленого, можуть мати форму від кулястих до



еліпсоїдальних, розміром $4 - 4,8 \times 3,5 - 4$ мкм, чітко бородавчасті (рис. 3.2).

Рис. 3.2 Мікроскопічне дослідження препаратів-відбитків *Trichoderma viride* КМВ-F-15 (збільшення $\times 1000$)

Триходема утворює хламідоспори – невеликі ділянки гіф. Вони покриті міцною потовщеною, іноді пігментованою оболонкою, містять великі запаси поживних речовин і здатні витримувати несприятливі умови існування. Препарати хламідоспор *Trichoderma* витримує різні умови зберігання, має більший термін зберігання, ніж конідіальні препарати, і кращий потенціал



застосування [70] (рис.3.3).

Рис. 3.3 Утворення хламідоспор *Trichoderma viride* КМВ-F-15
(збільшення $\times 1000$)

В роботі визначали вплив різних джерел вуглецю та азоту у складі поживного середовища на ріст та антагоністичну активність *Trichoderma viride* КМВ-F-15

3.1. Дослідження впливу сполук вуглецю на накопичення біомаси та фунгістатичну дію штаму *Trichoderma viride* КМВ-F-15

Для аналізу впливу різних джерел вуглецю на ріст *Trichoderma viride* були використані різні вуглеводні: моноцукри (глюкоза, фруктоза), біцукри (сахароза, мальтоза), багатоатомні спирти (гліцерин) та складні органічні сполуки (зелена патока, екстракт кукурудзи) у концентрації 2%. Ці вуглецевмісні сполуки були додані до базового рідкого середовища Чапека.

В якості контролю використовувалося стандартне рідинне середовище Чапека з сахарозою. Визначено, що *T. viride* КМВ-F-15 здатна засвоювати різні вуглецевмісні сполуки (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Вплив сполук вуглецю на вихід біомаси
***Trichoderma viride* КМВ-F-15 за глибинного культивування (n=3)**

Джерело вуглецю	Суша біомаса г/л
Сахароза (контроль)	2,13 ± 0,067 ^a
Глюкоза	2,67 ± 0,067 ^{ab}
Фруктоза	3,07 ± 0,267 ^{ab}
Мальтоза	1,87 ± 0,267 ^a
Гліцерин	5,00 ± 0,503 ^d
Зелена патока	4,87 ± 0,267 ^{cd}
Кукурудзяний екстракт	3,60 ± 0,115 ^{bc}

Примітка: різні літери у рядку вказують на достовірну різницю середніх (за критерієм Тьюкі, $P < 0,05$).

Використання гліцерину призвело до найвищого приросту біомаси – $5 \pm 0,503$ г/л, що вдвічі перевищує вміст біомаси в контрольному середовищі ($2,13 \pm 0,067$ г/л). Інші джерела вуглеводів показали менший приріст біомаси, від $1,87 \pm 0,267$ до $4,87 \pm 0,267$ г/л. Також виявлено, що приріст біомаси, який перевищує контроль, спостерігався при використанні зеленої патоки, кукурудзяного екстракту та фруктози.

Із даних літературних джерел отримано інформацію, що ріст *T. hamatum* у глюкозі був набагато кращим, ніж у сахарозі, оскільки глюкоза є простішим метаболітом, ніж сахароза [71], це підтверджено результатами нашого дослідження, коли суха біомаса на середовищі з глюкозою становила 2,67 г/л, в той час як із сахарозою – 2,13 г/л.

При перевірці фунгістатичної активності фільтратів культуральних рідин, отриманих від середовищ із різними джерелами вуглецю показано

(табл. 3.2), що інгібування росту *F. culmorum* IMB-F-50716 відносно контролю на 3 добу було у межах 55,9-70 %, проте достовірної різниці між середніми значеннями не встановлено.

Таблиця 3. 2

**Фунгістатична активність фільтратів культуральних рідин
T. viride KMB-F-15 відносно *F. culmorum* IMB-F-50716 (n=3)**

Джерело вуглецю	3 доба		6 доба	
	Діаметр колонії, мм	% інгібування відносно контролю	Діаметр колонії, мм	% інгібування відносно контролю
Контроль	48,33 ± 6			
Сахароза	14,50 ± 2,08 ^a	70	повністю покрила	100
Мальтоза	19,17 ± 2,20 ^a	60,2	повністю покрила	100
Фруктоза	20,50 ± 2,29 ^a	57,6	повністю покрила	100
Зелена патока	16,50 ± 1,80 ^a	65,8	повністю покрила	100
Глюкоза	20,17 ± 3,11 ^a	58,2	повністю покрила	100
Гліцерин	21,33 ± 2,68 ^a	55,9		94,7
Кукурудзяний екстракт	18,33 ± 3,59 ^a	62,1	повністю покрила	100

Примітка: а – вказує на недостовірність різниці між середніми (за критерієм Тьюкі, P >0,05).

Щодо показників на 6 добу, то можна вважати, що показник інгібування досягає 100 % (див. рис. 3.4, 3.5, 3.6) та табл. 3.2.

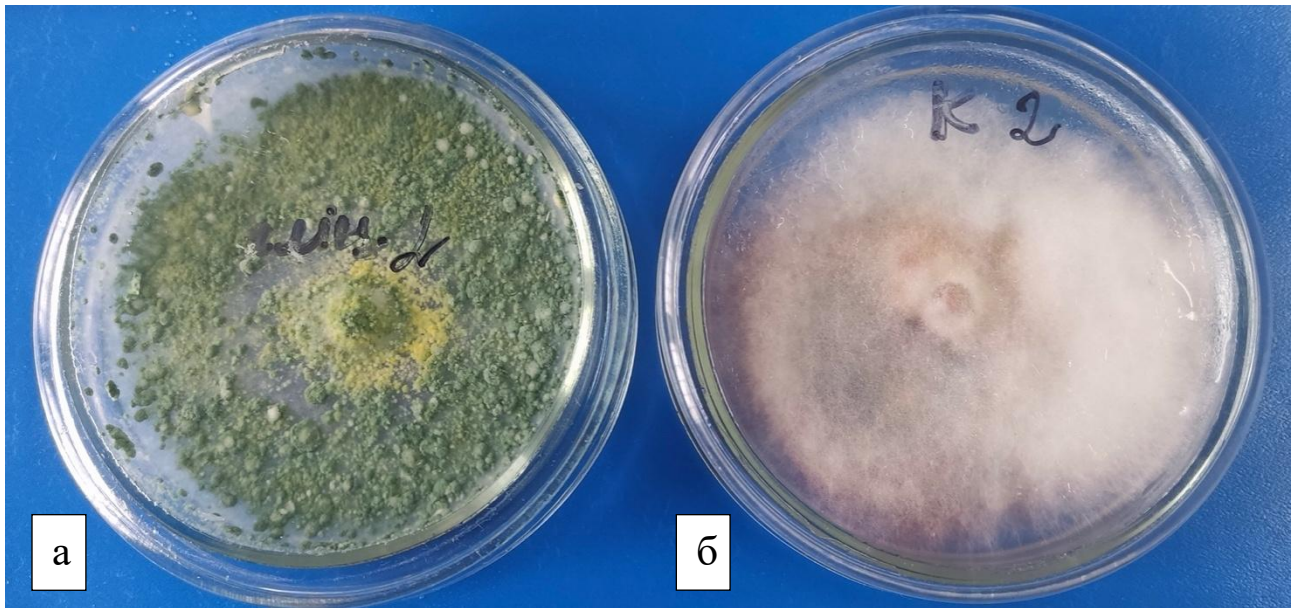


Рис. 3.4. Інгібування росту *F. culmorum* ІМВ-F-50716 фільтратом культуральної рідини *T. viride* КМВ-F-15, отриманої на середовищі з гліцерином: *а* – дослід, *б* – контроль.

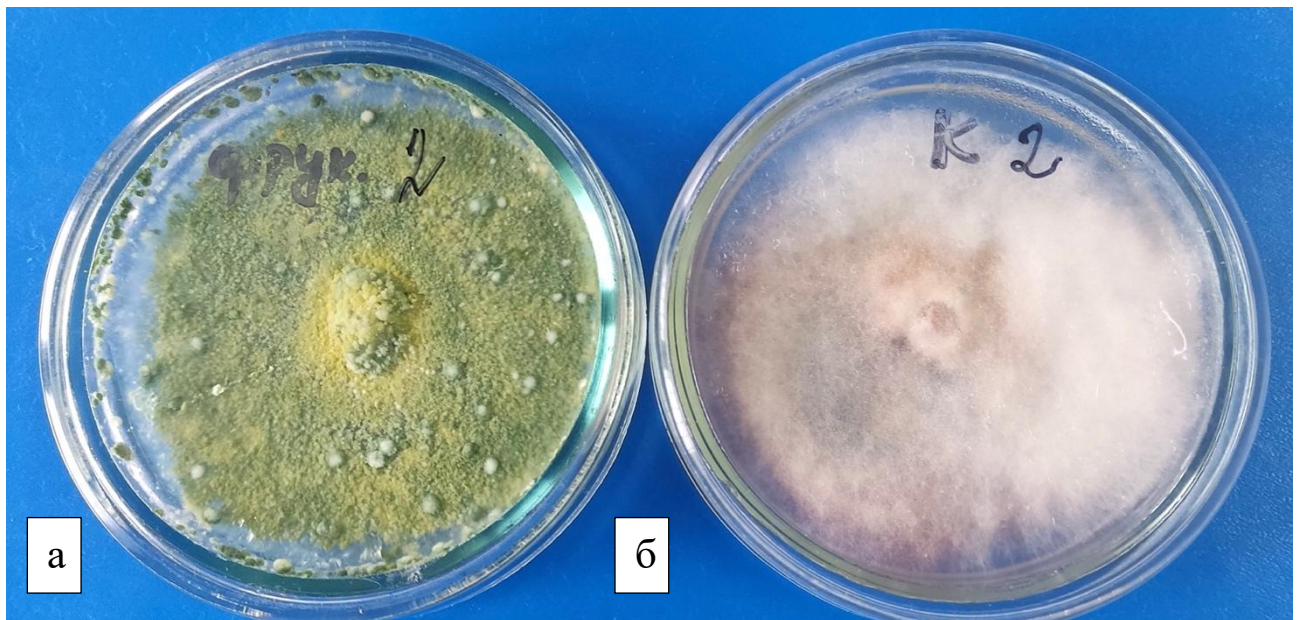


Рис. 3.5. Інгібування росту *F. culmorum* ІМВ-F-50716 фільтратом культуральної рідини *T. viride* КМВ-F-15, отриманої на середовищі з фруктозою: *а* – дослід, *б* – контроль.

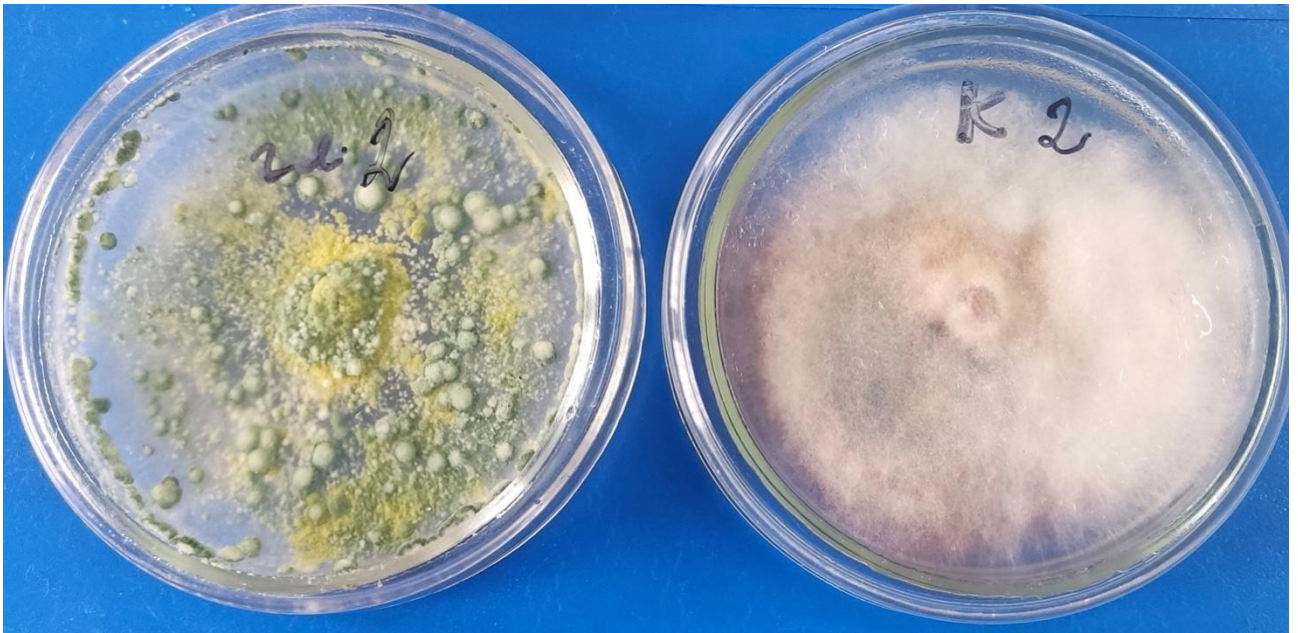


Рис. 3.6. Інгибування росту *F. culmorum* IMB-F-50716 фільтратом культуральної рідини *T. viride* КМВ-F-15, отриманої на середовищі з глюкозою: а – дослід, б – контроль.

Таким чином, Найбільший приріст біомаси отримано при використанні гліцерину – 5,00 г/л. Помірні значення виходу біомаси виявлено при використанні зеленої патоки (4,87 г/л), кукурудзяного екстракту (3,60 г/л), фруктози (3,07 г/л). Фунгістатична активність фільтрату культуральної рідини не залежно від джерела вуглеводів середовищі була високою, коливалась у межах 55,9-70 % інгибування росту *F. culmorum* IMB-F-50716 на 3 добу та досягала 100 % на 6 добу.

3.2. Дослідження впливу сполук азоту на накопичення біомаси та фунгістатичну дію *Trichoderma viride* КМВ-F-15

Досліджували вплив різних джерел азоту на накопичення біомаси та фунгістатичну дію *T. viride* КМВ-F-15. Як джерело азота використовували нітрат натрію, калію та амонію, хлорид та сульфат амонію. У формі складних органічних сполук –автолізат дріжджів та кукурудзяний екстракт, а також L-аргінінова та глютамінова амінокислоти. Вплив різних джерел азотного

живлення на ріст гриба оцінювали за показником виходу сухої біомаси (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

**Вплив азотних сполук на ріст штаму гриба
Trichoderma viride КМВ-F-15 за глибинного культивування (n=3)**

Джерела азоту	Суха біомаса, г/л
Натрій азотнокислий(контроль)	1,8 ± 0,12 ^{abc}
Калій азотнокислий	1,33 ± 0,13 ^{ab}
Амоній азотнокислий	2,4 ± 0,53 ^c
Амоній хлористий	3,33 ± 0,33 ^d
Амоній сірчанокислий	1,87 ± 0,13 ^{abc}
Автолізат дріжджів	4,4 ± 0,31 ^e
Кукурудзяний екстракт	2,67 ± 0,24 ^{cd}
L-глутамінова кислота	1,93 ± 0,47 ^{bc}
L-аргінін солянокислий	1 ± 0,12 ^a

Примітки: різні літери у рядку вказують на достовірну різницю середніх (за критерієм Тьюкі, P <0,05).

В результаті проведених досліджень було встановлено, що гриб *T. viride* КМВ-F-15 здатний засвоювати різні джерела азоту, але найкраще засвоювалися із органічних джерел автолізат дріжджів, що становить 4,4 ± 0,31 г/л сухої біомаси після культивування. Амоній хлористий є представником неорганічних сполук азоту, при використанні якого спостерігається високий вихід біомаси гриба, а саме 3,33 ± 0,33 г/л – це майже в 2 рази більше ніж у контрольному середовищі. Інші перевірені джерела органічного азоту – L-глутамінова амінокислотата кукурудзяний екстракт – давали менший вихід біомаси (1,93 ± 0,47 та 2,67 ± 0,24 г/л відповідно), в свою чергу L-аргінін солянокислий показав найгірший результат серед усіх джерел азоту (1 ± 0,12 г/л). Серед неорганічних джерел амоній азотнокислий посідає друге місце, а третє належить амонію

сірчанокиислому. Калій азотнокислий показав найменший результат, який навіть менший за контроль ($1,33 \pm 0,13$ г/л).

Дивлячись на загальний результат, можна зробити висновок, що найбільш сприятливими джерелами азоту для росту триходерми є органічні речовини, що підтверджується даними літературних джерел [72]. Було підтверджено значний ріст міцелію *T. aureoviride*, *T. viride* і *T. harzianum* при культивуванні в середовищах, що містять дріжджовий екстракт [71].

Перевірка фунгістатичної активності фільтратів культуральної рідини *T. viride* КМВ-F-15 відносно фітопатогена *F. culmorum* ІМВ-F-50716 показало, що найбільше пригнічення росту відмічалось при використанні середовища з автолізатом дріжджів, кукурудзяним екстрактом та L-глутаміною кислотою в якості джерел азотного живлення – 100 %, 100 % та 97,8 % інгібування росту, відповідно (табл. 3.4; рис. 3.7, 3.8, 3.9). Високий відсоток інгібування росту *F. culmorum* ІМВ-F-50716 відмічено при вирощуванні штаму триходерми на середовищах, до складу яких входили солі амонію, а саме амоній хлористий та амоній сірчанокисний (88,5 та 94% відповідно). Найменший відсоток інгібування серед усіх представлених джерел азоту встановлено при використанні амонію азотнокислого (83,9%).

Найвищий відсоток інгібування росту фітопатогену було зареєстровано при вирощуванні досліджуваного штаму триходерми у середовищі з додаванням кукурудзяного екстракту як єдиного джерела азотного живлення. У літературі показано, що фунгістатична активність досліджуваного штаму *Trichoderma lignorum* КМВ-F-14 залежить від джерела азоту у середовищі культивування. Встановлено високий відсоток інгібування росту *F. monileforme* КМВ-F-23 (58–64%) і *F. culmorum* ІМВ-F-50716 (63–73%) при використанні аргініну, кукурудзяного екстракту, дріжджового автолізату, амонію сірчанокислого, амонію хлористого та натрію азотнокислого у якості джерела азотного живлення [72].

Можна підсумувати, що позитивний вплив на фунгістатичну активність *T. viride* КМВ-F-15 чинять кукурудзяний екстракт, L-глутамінова кислота,

автолізат дріжджів, амоній хлористий та амоній сірчанокислий як джерела азотного живлення за глибинного культивування.

Таблиця 3.4

Фунгістатична активність фільтратів культуральних рідин штаму *T. viride* КМВ-F-15 по відношенню до фітопатогенних грибів *F. culmorum* ІМВ-F-50716 (n=3)

Джерело азоту	3 доба		6 доба	
	Діаметр колонії, мм	% інгібування відносно контролю	Діаметр колонії, мм	% інгібування відносно контролю
Контроль	45,5 ± 1,53 ^e		89 ± 0	
NaNO ₃	24 ± 1 ^{cd}	47,5	14,16 ± 3 ^c	84
KNO ₃	30 ± 5,92 ^d	34,1	11,33 ± 6,64 ^{bc}	87,3
NH ₄ NO ₃	16 ± 1,5 ^{ab}	64,8	14,33 ± 0,33 ^c	83,9
NH ₄ Cl	15,5 ± 1,04 ^a	65,9	5,33 ± 5,33 ^{abc}	94
(NH ₄) ₂ SO ₄	14,17 ± 2,20 ^a	68,8	10,17 ± 5,10 ^{bc}	88,5
Автолізат дріжджів	23,5 ± 5 ^{bcd}	48,4	0 ^a	100
Кукурудзяний екстракт	21 ± 0,5 ^{abc}	53,8	0 ^a	100
L-глутамінова кислота	18,83 ± 0,17 ^{abc}	58,7	2 ± 0,2 ^{ab}	97,8
L-аргінін солянокислий	18 ± 0 ^{abc}	60,4	15,92 ± 4,72 ^c	85,6

Примітки: різні літери у рядку вказують на достовірну різницю середніх (за критерієм Тьюкі, P <0,05).

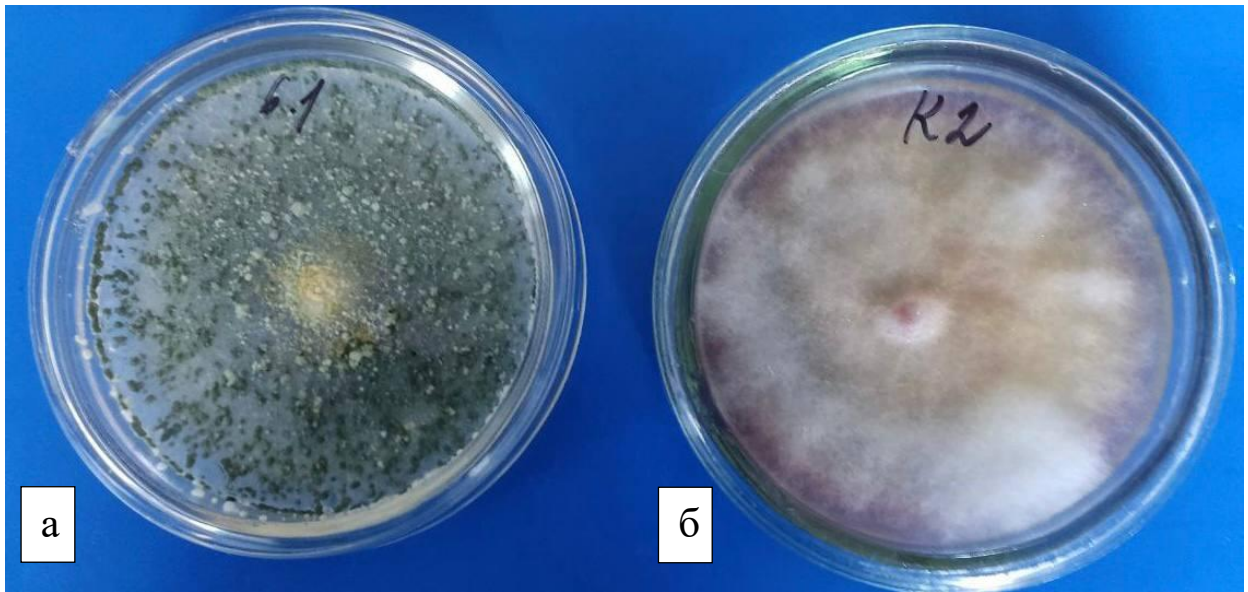


Рис. 3.7. Інгибування росту *F. culmorum* ІМВ-F-50716 фільтратом культуральної рідини *T. viride* КМВ-F-15, отриманої на середовищі завтолізатом дріжджів: *а* – дослід, *б* – контроль.

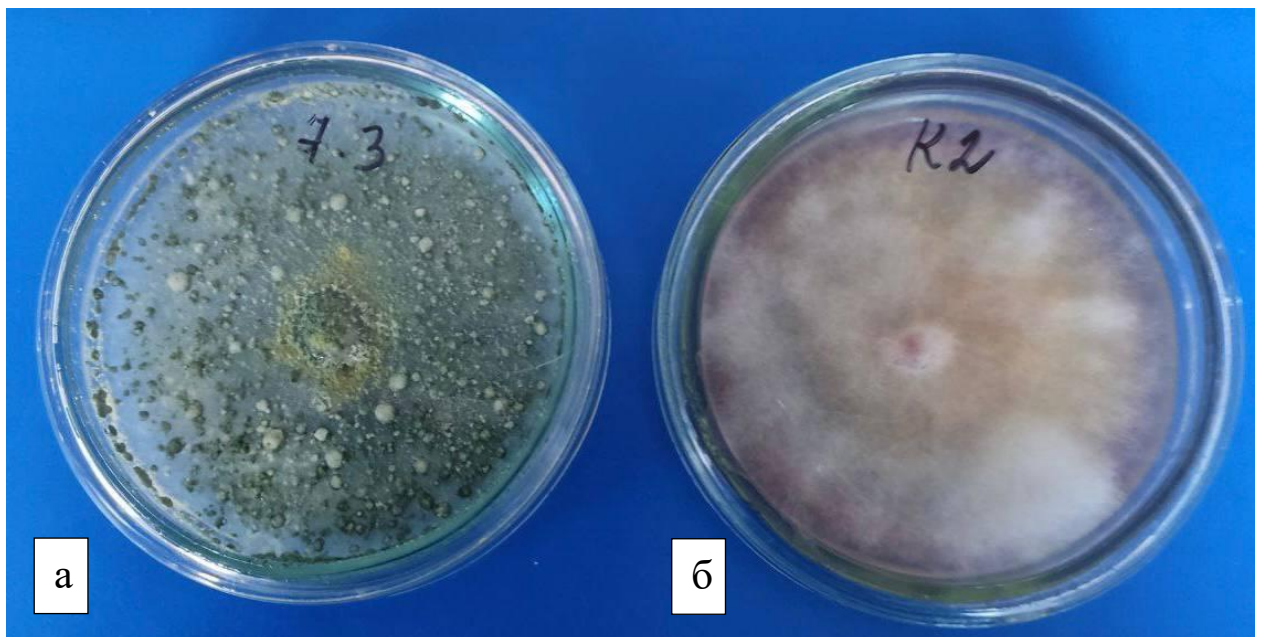


Рис. 3.8. Інгибування росту *F. culmorum* ІМВ-F-50716 фільтратом культуральної рідини *T. viride* КМВ-F-15, отриманої на середовищі з кукурудзяним екстрактом: *а* – дослід, *б* – контроль.

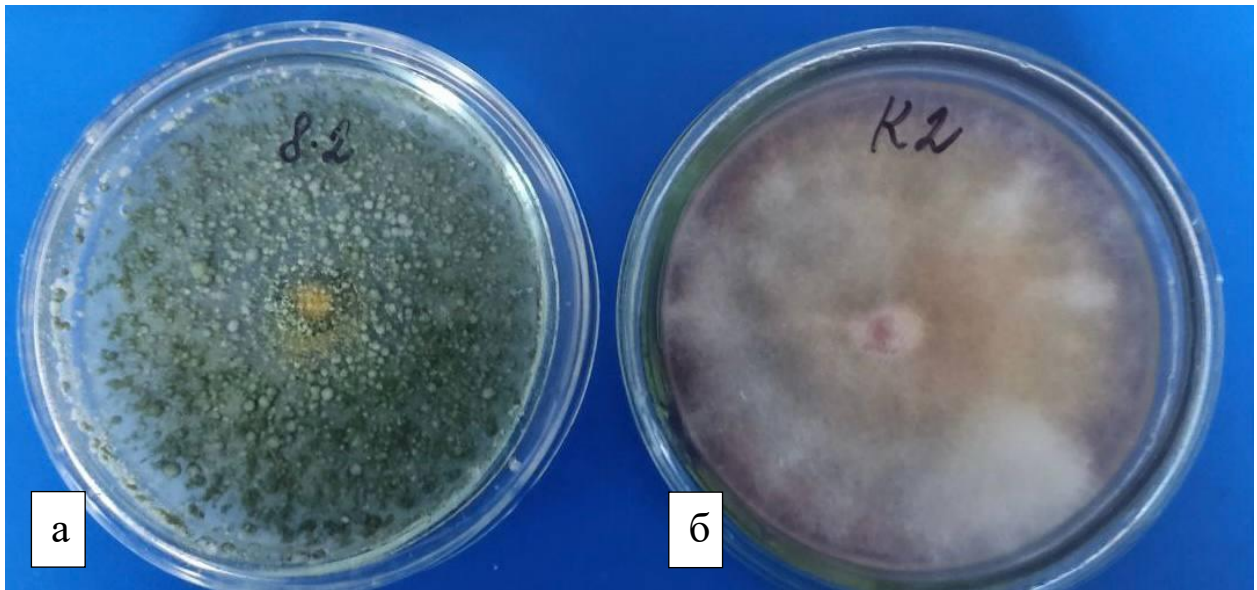


Рис. 3.9. Інгибування росту *F. culmorum* ІМВ-F-50716 фільтратом культуральної рідини *T. viride* КМВ-F-15, отриманої на середовищі з L-глютаміною кислотою: *a* – дослід, *б* – контроль.

Узагальнюючи результати проведених досліджень щодо підбору складу поживного середовища, можна зробити висновки, що для глибинного культивування штаму *T. viride* КМВ-F-15 з метою отримання препарату проти фітопатогенних грибів як джерело вуглецю доцільно використовувати гліцерин, а як джерело азоту – автолізатдріжджівабо з неорганічних – амоній хлористий, які забезпечують високий вихід біомаси та високий рівень фунгістатичної активності.

3.3. Повний факторний експеримент

Враховуючи попередні досліди з підбору середовища для глибинного культивування штаму *T. viride* КМВ-F-15, перспективного для захисту рослин від збудників мікозів, було з'ясовано, що гліцерин як джерело вуглецю сприяє накопиченню біомаси найкраще (таблиця 3.1).

Попередні досліди показали, що з неорганічних джерел азоту для триходерми найкращим є амоній хлористий. Тому з метою розробки

оптимізованого синтетичного середовища для культивування *T. viride* КМВ-
F-15 було взято за основу середовище такого складу (г/л): гліцерин – 20;
 NH_4Cl – 3; K_2HPO_4 – 1,3; KCl – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01,
яке виповнювало роль середнього рівня.

Оптимізацію поживного середовища проводили за трьома факторами:
гліцерином – x_1 , NH_4Cl – x_2 , K_2HPO_4 – x_3 , інші компоненти підтримували на
сталому рівні. План повного факторного експерименту ПФЕ наведено в
таблиці 3.5.

Таблиця 3.5

Матриця планування для ПФЕ-23

№ середовища	Кодовані змінні			Позначення рядків (фактори та їх взаємодія)
	x_1	x_2	x_3	
1	–	–	–	«1»
2	+	–	–	x_1
3	–	+	–	x_2
4	+	+	–	x_1x_2
5	–	–	+	x_3
6	+	–	+	x_1x_3
7	–	+	+	x_2x_3
8	+	+	+	$x_1x_2x_3$
9	0	0	0	

Відповідно до цього плану готували 9 поживних середовищ, в яких
вичерпані всі можливі комбінації досліджуваних факторів на двох рівнях; 9
середовище – контрольне, представляє собою основний (середній) рівень
варіювання факторів. У таблиці 3.6 наведені одиниці варіювання (λ)
досліджуваних факторів і концентрації, відповідні нижньому, верхньому і
середньому рівням.

Таблиця 3.6

Одиниці варіювання (λ) та концентрації компонентів середовища на середньому, нижньому і верхньому рівнях, г/л

Компоненти середовища	Фактор	Середній рівень «0»	Нижній рівень «-»	Верхній рівень «+»	Одиниця варіювання, λ
Гліцерин	x_1	20	10	30	10
NH_4Cl	x_2	3	2	4	1
K_2HPO_4	x_3	1,3	1	1,6	0,3
KCl	Постійний рівень – 0,5				
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Постійний рівень – 0,5				
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Постійний рівень – 0,01				

Параметрами оптимізації був вихід сухої біомаси в кінці культивування, яку оцінювали за виходом сухої біомаси ваговим методом [68].

Склад розрахованих поживних середовищ та вихід біомаси представлено у таблиці 3.7.

Таблиця 3.7

№ сер.	Гліцерин	NH_4Cl	K_2HPO_4	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	KCl	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Y* г/л
1	10	2	1	0,5	0,5	0,01	2,375
2	30	2	1	0,5	0,5	0,01	3,908
3	10	4	1	0,5	0,5	0,01	1,975
4	30	4	1	0,5	0,5	0,01	3,525
5	10	2	1,6	0,5	0,5	0,01	2,860
6	30	2	1,6	0,5	0,5	0,01	1,550
7	10	4	1,6	0,5	0,5	0,01	2,575
8	30	4	1,6	0,5	0,5	0,01	3,183
9	20	3	1,3	0,5	0,5	0,01	2,350

Склад поживних середовищ ПФЕ 2³ (г/л) та вихід біомаси (n=4)

Примітки: * - середнє значення сухої біомаси (Y) 4-х повторностей;

Статистична обробка даних та розрахунки коефіцієнтів рівняння регресії проводилася за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel 16, що наведено у додатку 1.

Було отримано лінійні коефіцієнти:

$$b_0 = 2,74; b_1 = 0,30; b_2 = 0,071; b_3 = - 0,20$$

Значимість коефіцієнтів регресії перевіряли за критерієм Стьюдента [73], з отриманих коефіцієнтів $b_2 = 0,071$ виявився незначимим.

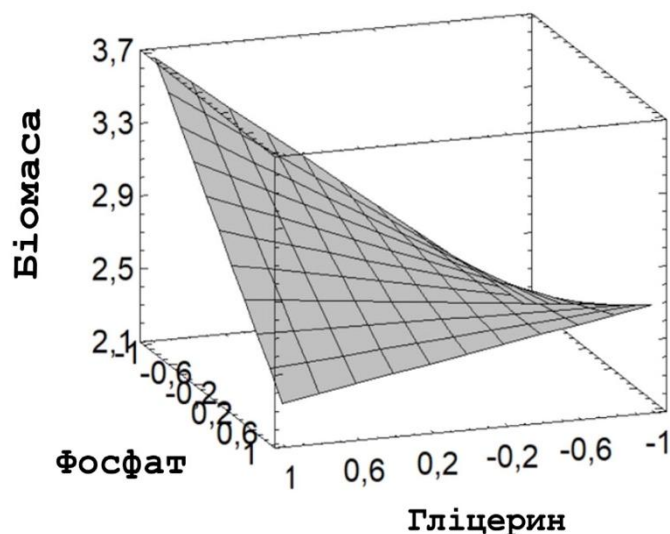
Лінійне рівняння регресії має такий вигляд: $y_1 = 2,74 + 0,30x_1 - 0,2x_3$. Проте перевірка адекватності цього рівняння регресії, проведена з використанням F- критерію Фішера [73] показала, що воно неадекватне.

Тому було розраховано коефіцієнти взаємного впливу, які всі виявилися значущими: $b_1b_2 = 0,242$; $b_1b_3 = -0,47$; $b_2b_3 = 0,27$; $b_1b_2b_3 = 0,2$.

Отримане неповне квадратне рівняння регресії має наступний вигляд: $y_1 = 2,74 + 0,30x_1 - 0,2x_3 + 0,242x_1x_2 + 0,27x_2x_3 - 0,47 x_1x_3 + 0,2x_1x_2x_3$ і є адекватним.

Модулі коефіцієнтів, розрахованих за результатами експерименту, вказують на силу впливу факторів, а знак при коефіцієнтах – на позитивний або негативний вплив на параметр оптимізації.

Значення вільного члена b_0 (2,74) відрізняється від центру експерименту (2,35), що також вказує на нелінійний характер дії



досліджуваних факторів.

Рис. 3.10. Розрахункова поверхня відгуку

За результатами рівняння регресії побудовано поверхню відгуку, яка має нелінійний характер (рис. 3.10).

Згідно отриманої математичної моделі, при збільшенні концентрації фосфату (x_3) за умови, якщо концентрація гліцерину підтримується у середовищі на нижньому рівні, відбувається підвищення виходу біомаси триходерми, але якщо при цьому гліцерин підтримується на верхньому рівні – зменшення біомаси (рис.3.11.а). Якщо збільшувати концентрацію гліцерину (x_1), але фосфат при цьому підтримувати на нижньому рівні – спостерігається збільшення виходу біомаси, якщо фосфат підтримувати на верхньому рівні – відповідно зменшення (рис. 3.11.б).

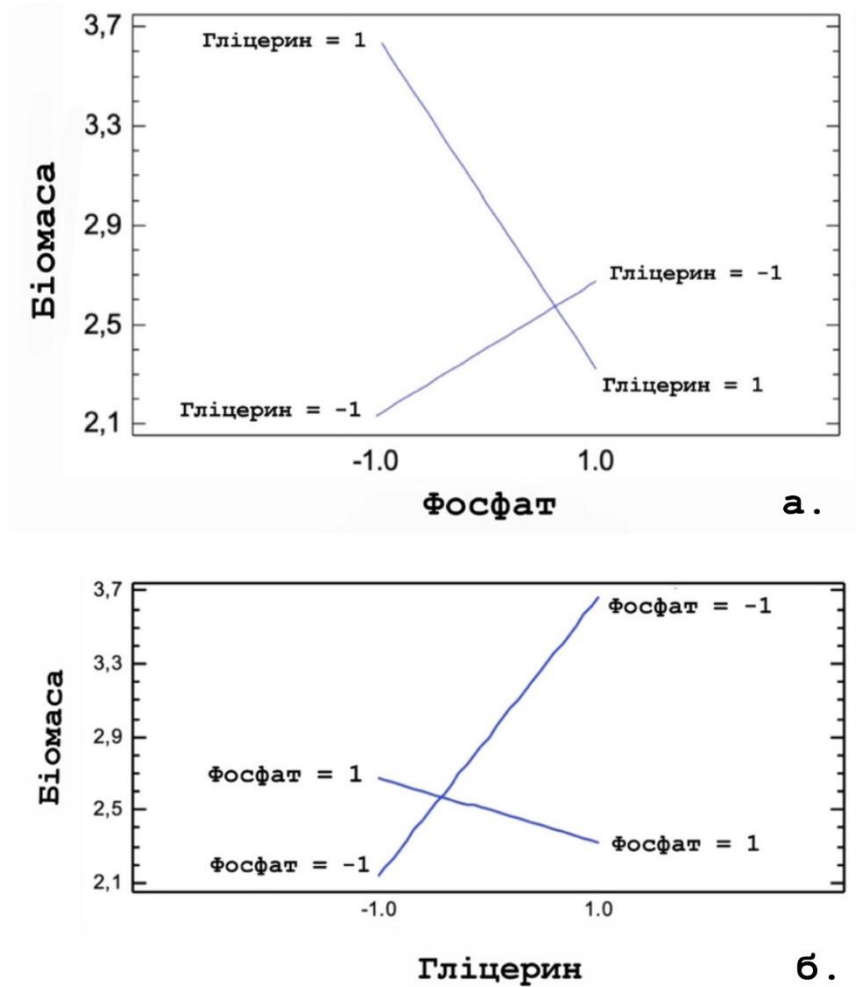


Рис. 3.11. Вплив факторів на вихід біомаси: а – фосфату, б – гліцерину.

Таким чином, згідно отриманому рівнянню регресії, при оптимізації середовища для глибинного культивування *T. viride* КМВ-F-15 необхідно збільшувати концентрацію гліцерину, бо він надає позитивний вплив, а фосфат впливає негативно – тому зменшувати його концентрацію.

3.4. Оптимізація кількісного складу поживного середовища за методом «крутого сходження»

Для визначення оптимальних величин значимих факторів, які дають максимально можливий вихід процесу, зазвичай використовують метод «крутого сходження» (рух у напрямку градієнта). У цьому випадку значення факторів слід змінювати пропорційно отриманих для них коефіцієнтів регресії з врахуванням їх знаку. Проте, навіть при неадекватності лінійного

рівняння, процес руху у напрямку градієнта, розрахований за лінійним рівнянням, може призвести до збільшення виходу процесу [67].

Для розрахунку концентрацій компонентів середовищ «крутого сходження» потрібно перейти від кодovаних до натуральних змінних. З цією метою треба обчислити $b_i \lambda_i$, тобто знайти добуток коефіцієнтів регресії (b_i) на одиницю варіювання (λ_i) для всіх факторів, у яких виявилися значущими коефіцієнти. Потім вибирають фактор, для якого добуток $b_i \lambda_i$ виявився найменшим за абсолютним значенням, і знаходять величини відношень $b_i \lambda_i$ інших факторів до $b_i \lambda_i$ для обраного фактора. Таким чином отримують коефіцієнти пропорційності K_i , яким приписують знаки, що відповідають знакам коефіцієнтів регресії кожного фактора. Вибравши новий крок варіювання λ^* для фактора з найменшим добутком $b_i \lambda_i$, обчислюють кроки для решти факторів, множачи величину обраного кроку на коефіцієнти пропорційності, які відповідають цим факторам [67].

Дані розрахунків наведені у таблиці 3.8.

Таблиця 3.8

Розрахунки для дослідів за планом «крутого сходження»

Показники	Фактори	
	Гліцерин – x_1	K_2HPO_4 – x_3
Основний рівень ПФЕ, г/л	20	1,3
Одиниця варіювання, λ_i у ПФЕ, г/л	10	0,3
Коефіцієнти регресії, b_i	0,3	0,2
Добуток $b_i \lambda_i$	3	0,06
Коефіцієнт пропорційності, K_i	50	1
Нова одиниця варіювання, λ^*	2,5	0,05

За вихідний рівень при сходженні бралось середовище, склад якого відповідає центру (основному, середньому рівню) ПФЕ. Контролем

служувало середовище з ПФЕ, у якому відзначено найкращий ріст (середовище №2).

Склад розрахованих поживних середовищ та вихід біомаси представлено у таблиці 3.9.

Таблиця 3.9

Склад поживних середовищ для методу «крутого сходження» (г/л) та вихід біомаси

Примітки:* - вихідне середовище (середній рівень); ** - середнє значення біомаси (Y) 3-х повторностей та середнє квадратичне відхилення;*** - кращий варіант повного факторного експерименту; різні літери у рядку вказують на достовірну різницю середніх (за критерієм Тьюкі, P <0,05).

В результаті проведення експерименту за методом «крутого сходження» у досліді №7 було досягнуто максимальний вихід біомаси, який становить 4,7 г/л. Подальший рух за градієнтом зменшував вихід процесу (рис. 3.12). Порівняно з вихідним середовищем (№1) вихід біомаси збільшився в 2,8 раз,

№ сер.	Гліцерин	K ₂ HPO ₄	NH ₄ Cl	MgSO ₄ ×7H ₂ O	KCl	FeSO ₄ ×7H ₂ O	Y** г/л
1*	20	1,3	3	0,5	0,5	0,01	1,667± 0,46 ^a
2	22,5	1,25	3	0,5	0,5	0,01	2,167 ± 0,40 ^{ab}
3	25	1,2	3	0,5	0,5	0,01	1,967 ± 0,46 ^{ab}
4	27,5	1,15	3	0,5	0,5	0,01	1,867 ± 0,15 ^{ab}
5	30	1,1	3	0,5	0,5	0,01	3,867± 1,16 ^{de}
6	32,5	1,04	3	0,5	0,5	0,01	3,333 ± 0,81 ^{cd}
7	35	0,99	3	0,5	0,5	0,01	4,700 ± 1,23 ^e
8	37,5	0,94	3	0,5	0,5	0,01	3,200 ± 1,14 ^{cd}
9	40	0,89	3	0,5	0,5	0,01	2,700 ± 1,15 ^{bc}
10***	30	1	2	0,5	0,5	0,01	3,500± 0,62 ^{cd}

а з кращим варіантом повного факторного експерименту (№10) – в 1,3 рази.

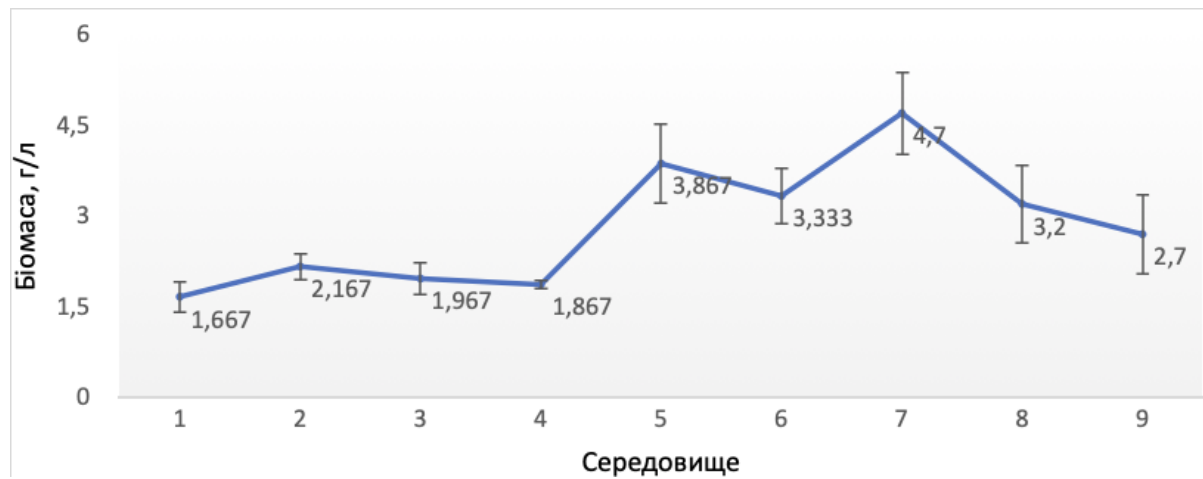


Рис. 3.12. Вихід біомаси *T. viride* при оптимізації складу середовища за методом «крутого сходження»

Перевірка фільтрату культуральної рідини *T. viride*, вирощеної на середовищі №7, на фунгістатичну активність по відношенню до фітопатогенного гриба *Fusarium culmorum* показала високий показник



інгібування росту – 84 % (рис. 3.13).

Рис. 3.13. Фунгістатична активність фільтрату культуральної рідини *T. viride*

Таким чином, за допомогою математичних методів планування експериментів встановлено оптимальний склад поживного середовища для

культивування *T. viride* КМВ-F-15(г/л): гліцерин – 35; K_2HPO_4 – 0,99; NH_4Cl – 3; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,5; KCl – 0,5; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,01.

ВИСНОВКИ

1. Досліджено вплив джерел вуглецю на ріст та фунгістатичну активність *Trichoderma viride* КМВ-F-15. Найбільший приріст біомаси отримано при використанні гліцерину – 5,00 г/л. Помірні значення виходу біомаси виявлено при використанні зеленої патоки (4,87 г/л), кукурудзяного екстракту (3,60 г/л), фруктози (3,07 г/л).

2. Фунгістатична активність фільтрату культуральної рідине залежно від джерела вуглецю в середовищі була високою, коливалась у межах 55,9-70 % інгібування росту *F. culmorum* ІМВ-F-50716 на 3 добу та досягала 100 % на 6 добу.

3. Досліджено вплив неорганічних та органічних джерел азоту на накопичення біомаси *Trichoderma viride* КМВ-F-15. Найбільш сприятливими для росту гриба виявилися із органічних джерел автолізат дріжджів, вихід сухої біомаси становить 4,4 г/л, а з неорганічних – амоній хлористий, що показав результат 3,33 г/л.

4. Виявлено, що найбільший відсоток інгібування росту фітопатогену *F.culmorum* ІМВ-F-50716 спостерігається при вирощуванні штаму триходерми у середовищі з додаванням кукурудзяного екстракту, автолізату дріжджів чи L-глутамінової кислоти в якості джерел азотного живлення – 100 %, 100 % та 97,8 % інгібування росту, відповідно, а з неорганічних джерел – амоній хлористий (94 %).

5. За допомогою повного факторного експерименту (ПФЕ-2³) отримано математичну модель росту штаму *Trichoderma viride* КМВ-F-15в залежності від концентрації джерел вуглецю, азоту та фостору. Встановлено, що на вихід біомаси статистично достовірно впливають концентрації гліцерину та фосфату (K₂HPO₄). Коефіцієнт регресії при першому факторі (гліцерин) свідчить про позитивний вплив на вихід біомаси, а при третьому факторі (фосфат) – про зниження параметру оптимізації.

6. При проведенні досліду за методом «крутого сходження» концентрація гліцерину в оптимізованому поживному середовищі була

збільшена з 20 г/л до 35 г/л, фосфату – зменшена з 1,3 г/л до 0,99 г/л, а амоніюхлористого – залишена на вихідному рівні (3 г/л). Порівняно з вихідним середовищем вихід біомаси *Trichoderma viride* КМВ-*F*- 15 в оптимізованому середовищі збільшився в 2,8 раз. Фунгістатична активність фільтрату культуральної рідини триходерми, вирощеної на оптимізованому середовищі, становила 84 %.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Yao X, Guo H, Zhang K, Zhao M, Ruan J, Chen J. Trichoderma and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. *Front Microbiol.* 2023 May 3;14:1160551.
2. Martinez Y, Ribera J, Schwarze FWMR, De France K. Biotechnological development of Trichoderma-based formulations for biological control. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2023 Sep;107(18):5595-5612.
3. Thambugala KM, Daranagama DA, Phillips AJL, Kannangara SD, Promputtha I. Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Nov 30;10:604923.
4. Andrzejak R, Janowska B. Trichoderma spp. Improves Flowering, Quality, and Nutritional Status of Ornamental Plants. *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 10;23(24):15662.
5. Trichoderma Species: Versatile Plant Symbionts. Paulina Guzmán-Guzmán, María Daniela Porras-Troncoso, Vianey Olmedo-Monfil, and Alfredo Herrera-Estrella. *Phytopathology®* 2019 109:1, 6-16
6. Guzmán-Guzmán P, Kumar A, de Los Santos-Villalobos S, Parra-Cota FI, Orozco-Mosqueda MDC, Fadiji AE, Hyder S, Babalola OO, Santoyo G. Trichoderma Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases-A Review. *Plants (Basel).* 2023 Jan 17;12(3):432.
7. Martinez Y, Ribera J, Schwarze FWMR, De France K. Biotechnological development of Trichoderma-based formulations for biological control. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2023 Sep;107(18):5595-5612.
8. Tyśkiewicz R, Nowak A, Ozimek E, Jaroszuk-Ścisiel J. Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 19;23(4):2329.
9. Guzmán-Guzmán P, Kumar A, de Los Santos-Villalobos S, Parra-Cota FI, Orozco-Mosqueda MDC, Fadiji AE, Hyder S, Babalola OO, Santoyo G.

- Trichoderma Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases-A Review. *Plants (Basel)*. 2023 Jan 17;12(3):432.
10. Lodi RS, Peng C, Dong X, Deng P, Peng L. *Trichoderma hamatum* and Its Benefits. *J Fungi (Basel)*. 2023 Oct 8;9(10):994.
 11. Brizuela AM, Gálvez L, Arroyo JM, Sánchez S, Palmero D. Evaluation of *Trichoderma* spp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* and *Fusarium* wilt Control in Asparagus Crop. *Plants (Basel)*. 2023 Aug 1;12(15):2846.
 12. Halifu S., Deng X., Song X., Song R. Effects of two *Trichoderma* strains on plant growth, rhizosphere soil nutrients and fungal community of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* annual seedlings. *Forests*. 2019;10:758.
 13. Garstecka Z, Antoszewski M, Mierek-Adamska A, Krauklis D, Niedojadło K, Kaliska B, Hryniewicz K, Dąbrowska GB. *Trichoderma viride* Colonizes the Roots of *Brassica napus* L., Alters the Expression of Stress-Responsive Genes, and Increases the Yield of Canola under Field Conditions during Drought. *Int J Mol Sci*. 2023 Oct 19;24(20):15349.
 14. Hanaka, A.; Ozimek, E.; Reszczyńska, E.; Jaroszuk-Ściśeł, J.; Stolarz, M. Plant Tolerance to Drought Stress in the Presence of Supporting Bacteria and Fungi: An Efficient Strategy in Horticulture. *Horticulturae* 2021, 7, 390.
 15. He C, Liu C, Liu H, Wang W, Hou J, Li X. Dual inoculation of dark septate endophytes and *Trichoderma viride* drives plant performance and rhizosphere microbiome adaptations of *Astragalus mongholicus* to drought. *Environ Microbiol*. 2022 Jan;24(1):324-340.
 16. Metwally RA, Soliman SA. Alleviation of the adverse effects of NaCl stress on tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.) by *Trichoderma viride* through the antioxidative defense system. *Bot Stud*. 2023 Feb 9;64(1):4.
 17. Dhub Akram Ghorbanpour, Azam Salimi, Mohammad Ali Tajick Ghanbary, Hemmatollah Pirdashti, Ali Dehestani, The effect of *Trichoderma harzianum* in mitigating low temperature stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants, *Scientia Horticulturae*, Volume 230, 2018, Pages 134-141, ISSN 0304-4238.

18. Tyśkiewicz R, Nowak A, Ozimek E, Jaroszuk-Ściśeł J. Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 19;23(4):2329.
19. Benítez T., Rincón M.A., Limón C.M., Codón C.A. Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. *Int. Microbiol.* 2004;7:249–260.
20. Halifu, S.; Deng, X.; Song, X.; Song, R. Effects of Two Trichoderma Strains on Plant Growth, Rhizosphere Soil Nutrients, and Fungal Community of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* Annual Seedlings. *Forests* 2019, 10, 758.
21. Tyśkiewicz R, Nowak A, Ozimek E, Jaroszuk-Ściśeł J. Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 19;23(4):2329.
22. Song M, Wang X, Xu H, Zhou X, Mu C. Effect of Trichoderma viride on insoluble phosphorus absorption ability and growth of *Melilotus officinalis*. *Sci Rep.* 2023 Jul 31;13(1):12345.
23. Garstecka Z, Antoszewski M, Mierek-Adamska A, Krauklis D, Niedojadło K, Kaliska B, Hryniewicz K, Dąbrowska GB. Trichoderma viride Colonizes the Roots of Brassica napus L., Alters the Expression of Stress-Responsive Genes, and Increases the Yield of Canola under Field Conditions during Drought. *Int J Mol Sci.* 2023 Oct 19;24(20):15349.
24. Metwally RA, Abdelhameed RE, Soliman SA, Al-Badwy AH. Potential use of beneficial fungal microorganisms and C-phycocyanin extract for enhancing seed germination, seedling growth and biochemical traits of *Solanum lycopersicum* L. *BMC Microbiol.* 2022 Apr 21;22(1):108.
25. Wu LX, Wang Y, Lyu H, Chen XD. Effects of a compound Trichoderma agent on *Coptis chinensis* growth, nutrients, enzyme activity, and microbial community of rhizosphere soil. *PeerJ.* 2023 Jul 12;11:e15652.

26. Joo JH, Hussein KA. Biological Control and Plant Growth Promotion Properties of Volatile Organic Compound-Producing Antagonistic *Trichoderma* spp. *Front Plant Sci.* 2022 Jul 26;13:897668.
27. Duan X, Zou C, Jiang Y, Yu X, Ye X. Effects of Reduced Phosphate Fertilizer and Increased *Trichoderma* Application on the Growth, Yield, and Quality of Pepper. *Plants (Basel).* 2023 Aug 19;12(16):2998.
28. Ali I, Khan A, Ali A, Ullah Z, Dai DQ, Khan N, Khan A, Al-Tawaha AR, Sher H. Iron and zinc micronutrients and soil inoculation of *Trichoderma harzianum* enhance wheat grain quality and yield. *Front Plant Sci.* 2022 Sep 7;13:960948.
29. Thambugala KM, Daranagama DA, Phillips AJL, Kannangara SD, Promputtha I. Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Nov 30;10:604923.
30. Safari Motlagh MR, Farokhzad M, Kaviani B, Kulus D. Endophytic Fungi as Potential Biocontrol Agents against *Sclerotium rolfsii* Sacc.-The Causal Agent of Peanut White Stem Rot Disease. *Cells.* 2022 Aug 25;11(17):2643.
31. Monte E. The sophisticated evolution of *Trichoderma* to control insect pests. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023 Mar 21;120(12):e2301971120.
32. Morán-Diez ME, Martínez de Alba ÁE, Rubio MB, Hermosa R, Monte E. *Trichoderma* and the Plant Heritable Priming Responses. *J Fungi (Basel).* 2021 Apr 19;7(4):318. doi: 10.3390/jof7040318. PMID: 33921806; PMCID: PMC8072925.
33. Sunil Kumar, Vaishali Shukla, Yashoda Nandan Tripathi, Kumari Divyanshu, Mukesh Yadav, Ram Sanmukh Upadhyay. Biochemical changes, antioxidative profile, and efficacy of the bio-stimulant in plant defense response against *Sclerotinia sclerotiorum* in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Published: November 28, 2023
34. Chan ME, Tan JY, Lee YY, Lee D, Fong YK, Mutwil M, Wong JY, Hong Y. Locally Isolated *Trichoderma harzianum* Species Have Broad Spectrum

- Biocontrol Activities against the Wood Rot Fungal Species through Both Volatile Inhibition and Mycoparasitism. *J Fungi (Basel)*. 2023 Jun 15;9(6):675.
35. Abdelkhalek A, Al-Askar AA, Arishi AA, Behiry SI. *Trichoderma hamatum* Strain Th23 Promotes Tomato Growth and Induces Systemic Resistance against Tobacco Mosaic Virus. *J Fungi (Basel)*. 2022 Feb 25;8(3):228.
36. Sefer Ö, Özsoy E, Yörük E, Özkale E. Determining the biocontrol capacities of *Trichoderma* spp. originating from Turkey on *Fusarium culmorum* by transcriptional and antagonistic analyses. *Front Fungal Biol*. 2023 Nov 13;4:1278525.
37. Ponsankar A, Senthil-Nathan S, Vasantha-Srinivasan P, Pandiyan R, Karthi S, Kalaivani K, Chellappandian M, Narayanaswamy R, Thanigaivel A, Patcharin K, Mahboob S, Al-Ghanim KA. Systematic induced resistance in *Solanum lycopersicum* (L.) against vascular wilt pathogen (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) by *Citrullus colocynthis* and *Trichoderma viride*. *PLoS One*. 2023 May 2;18(5):e0278616.
38. Wu J, Zhu J, Zhang D, Cheng H, Hao B, Cao A, Yan D, Wang Q, Li Y. Beneficial effect on the soil microenvironment of *Trichoderma* applied after fumigation for cucumber production. *PLoS One*. 2022 Aug 2;17(8):e0266347.
39. Ali E, Amjad I, Rehman A. Evaluation of azo dyes degradation potential of fungal strains and their role in wastewater treatment. *Saudi J Biol Sci*. 2023 Aug;30(8):103734. doi: 10.1016/j.sjbs.2023.103734. Epub 2023 Jul 4. PMID: 37483839; PMCID: PMC10359666.
40. El-Ghonemy DH, Ali SA, Abdel-Megeed RM, Elshafei AM. Therapeutic impact of purified *Trichoderma viride* L-asparaginase in murine model of liver cancer and in vitro Hep-G2 cell line. *J Genet Eng Biotechnol*. 2023 Mar 30;21(1):38.

41. Takahashi T. Cyclosporin A promote hair epithelial cell proliferation and modulates protein kinase C expression and translocation in hair epithelial cells. *J Invest Dermatol.* 2001; 117:605–611.
42. Abd-Elsalam KA. Special Issue: Fungal Nanotechnology. *J Fungi (Basel).* 2021 Jul 21;7(8):583.
43. https://www.reportlinker.com/p06193716/Nanotechnology-Services-Global-Market-Report.html?utm_source=GNW, доступ 20 лютого 2022 р.
44. Alghuthaymi MA, Abd-Elsalam KA, AboDaham HM, Ahmed FK, Ravichandran M, Kalia A, Rai M. Trichoderma: An Eco-Friendly Source of Nanomaterials for Sustainable Agroecosystems. *J Fungi (Basel).* 2022 Apr 2;8(4):367.
45. Singh RP, Handa R, Manchanda G. Nanoparticles in sustainable agriculture: An emerging opportunity. *J Control Release.* 2021 Jan 10;329:1234-1248.
46. Tomah AA, Zhang Z, Alamer ISA, Khattak AA, Ahmed T, Hu M, Wang D, Xu L, Li B, Wang Y. The Potential of Trichoderma-Mediated Nanotechnology Application in Sustainable Development Scopes. *Nanomaterials (Basel).* 2023 Sep 1;13(17):2475. doi: 10.3390/nano13172475. PMID: 37686983; PMCID: PMC10490099.
47. Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus *T. asperellum*
P Mukherjee, M Roy, B P Mandal, G K Dey, P K Mukherjee, J Ghatak, A K Tyagi and S P Kale, Published 29 January 2008 • IOP Publishing Ltd, *Nanotechnology*, Volume 19, Number 7, Citation P Mukherjee et al 2008 *Nanotechnology* 19 075103.
48. Gemishev O, Panayotova M, Gicheva G, Mintcheva N. Green Synthesis of Stable Spherical Monodisperse Silver Nanoparticles Using a Cell-Free Extract of *Trichoderma reesei*. *Materials (Basel).* 2022 Jan 9;15(2):481.
49. Devi T Prameela Kulanthaivel, S, Kamil Deeba, Borah Jyoti Lekha, Prabhakaran N, Srinivasa N. Biosynthesis of silver nanoparticles from

- Trichoderma species. NISCAIR-CSIR, India. Jul-2013. ISSN: 0975-1009 (Online); 0019-5189 (Print)
50. Abdallah Mohamed Elgorban, Abdullah Naser Al-Rahmah, Shaban Rushdy Sayed, Abdurahman Hirad, Ashraf Abdel-Fattah Mostafa & Ali Hassan Bahkali (2016) Antimicrobial activity and green synthesis of silver nanoparticles using *Trichoderma viride*, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30:2, 299-304.
51. Tomah AA, Zhang Z, Alamer ISA, Khattak AA, Ahmed T, Hu M, Wang D, Xu L, Li B, Wang Y. The Potential of Trichoderma-Mediated Nanotechnology Application in Sustainable Development Scopes. *Nanomaterials (Basel)*. 2023 Sep 1;13(17):2475.
52. Shobha B, Lakshmeesha TR, Ansari MA, Almatroudi A, Alzohairy MA, Basavaraju S, Alurappa R, Niranjana SR, Chowdappa S. Mycosynthesis of ZnO Nanoparticles Using *Trichoderma* spp. Isolated from Rhizosphere Soils and Its Synergistic Antibacterial Effect against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Fungi (Basel)*. 2020 Sep 20;6(3):181.
53. Zaki SA, Ouf SA, Albarakaty FM, Habeb MM, Aly AA, Abd-Elsalam KA. Trichoderma harzianum-Mediated ZnO Nanoparticles: A Green Tool for Controlling Soil-Borne Pathogens in Cotton. *J Fungi (Basel)*. 2021 Nov 10;7(11):952.
54. Shobha B, Lakshmeesha TR, Ansari MA, Almatroudi A, Alzohairy MA, Basavaraju S, Alurappa R, Niranjana SR, Chowdappa S. Mycosynthesis of ZnO Nanoparticles Using *Trichoderma* spp. Isolated from Rhizosphere Soils and Its Synergistic Antibacterial Effect against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Fungi (Basel)*. 2020 Sep 20;6(3):181. doi: 10.3390/jof6030181. PMID: 32962271; PMCID: PMC7558757.
55. Aradhana Mishra, Madhuree Kumari, Shipra Pandey, Vasvi Chaudhry, K.C. Gupta, C.S. Nautiyal. Biocatalytic and antimicrobial activities of gold nanoparticles synthesized by *Trichoderma* sp., *Bioresource Technology*, Volume 166, 2014, Pages 235-242, ISSN 0960-8524,

56. Wadhvani SA, Shedbalkar UU, Singh R, Chopade BA. Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016 Mar;100(6):2555-66.
57. Tomah AA, Zhang Z, Alamer ISA, Khattak AA, Ahmed T, Hu M, Wang D, Xu L, Li B, Wang Y. The Potential of Trichoderma-Mediated Nanotechnology Application in Sustainable Development Scopes. *Nanomaterials (Basel).* 2023 Sep 1;13(17):2475.
58. Begna R, Urge M, Negesse T, Animut G. Performances, carcass characteristics, and economic benefit of yearling Hararghe highland rams fed diet containing concentrate mixtures and sugarcane bagasse or rice husk treated with *Trichoderma viride* and effective microorganisms. *Food Sci Nutr.* 2023 Sep 15;11(12):7686-7697.
59. Roba RB, Letta MU, Aychiluhim TN, Minneeneh GA. Intake, digestibility, growth performance and blood profile of rams fed sugarcane bagasse or rice husk treated with *Trichoderma viride* and effective microorganisms. *Heliyon.* 2022 Dec 1;8(12):e11958.
60. Nidhee Chaudhary, Monendra Grover. Bioindustrial applications of thermostable Endoglucanase purified from *Trichoderma viride* towards the conversion of agrowastes to value-added products. *Protein Expression and Purification.* Volume 211, November 2023, 106324
61. Bai B, Liu C, Zhang C, He X, Wang H, Peng W, Zheng C. *Trichoderma* species from plant and soil: An excellent resource for biosynthesis of terpenoids with versatile bioactivities. *J Adv Res.* 2023 Jul;49:81-102.
62. Lakhdari W, Benyahia I, Bouhenna MM, Bendif H, Khelafi H, Bachir H, Ladjal A, Hammi H, Mouhoubi D, Khelil H, Alomar TS, AlMasoud N, Boufafa N, Boufahja F, Dehliz A. Exploration and Evaluation of Secondary Metabolites from *Trichoderma harzianum*: GC-MS Analysis, Phytochemical Profiling, Antifungal and Antioxidant Activity Assessment. *Molecules.* 2023 Jun 27;28(13):5025.

63. Chóez-Guaranda I, Espinoza-Lozano F, Reyes-Araujo D, Romero C, Manzano P, Galarza L, Sosa D. Chemical Characterization of *Trichoderma* spp. Extracts with Antifungal Activity against Cocoa Pathogens. *Molecules*. 2023 Apr 4;28(7):3208.
64. Ahmed AI, Abou-Taleb KAA, Abd-Elhalim BT. Characterization and application of tannase and gallic acid produced by co-fungi of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* utilizing agro-residues substrates. *Sci Rep*. 2023 Oct 5;13(1):16755.
65. Андреюк Є.І., Валагурова Є.В. Основи екології ґрунтових мікроорганізмів. АН України, Ін-т мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного. Київ : Наукова Думка, 1992. 221 с..
66. Пилипчук М. І., Григор'єв А. С., Шостак В. В. Основи наукових досліджень: Підручник. – К.: Знання, 2007. – 270 с.
67. Математические модели в ЭМВ в микробиологической практике / Ю. Р. Малашенко, Ф. В. Мучник, В.А. Романовская, Ю.С. Садовников – Киев: Наук. Думка, 1980. – 196 с.
68. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник/ М.Д. Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. – 252 с.
69. Буцяк А.А., Калин Б.М. Мікроорганізми як альтернатива пестицидам у виробництві екологічно безпечної продукції рослинництва. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.Ж. Гжицького. 2013. Том 15. № 1 (55). С. 30-34.
70. Peng X, Wu B, Zhang S, Li M, Jiang X. Transcriptome Dynamics Underlying Chlamydospore Formation in *Trichoderma virens* GV29-8. *Front Microbiol*. 2021 Jun 8;12:654855.
71. Bianca Caroline Rossi-Rodrigues; Márcia Regina Brochetto-Braga; Sâmia Maria Tauk-Tornisielo; Eleonora Cano Carmona; Valeska Marques Arruda; José Chaud Netto. Comparative growth of *trichoderma* strains in

- different nutritional sources, using bioscreen c automated system. Brazilian Journal of Microbiology (2009) 40:404-410 ISSN 1517-8382
72. Железняк М. Ю., Дрегваль О. А., Черевач Н. В., Скляр Т. В. Вплив джерел азотного живлення на накопичення біомаси та фунгістатичну активність *Trichoderma lignorum* КМВ-F-14. ISSN 2077-4214. Вісник проблем біології і медицини – 2019 – Вип. 1, том 1 (148)
73. Altomare C, Norvell WA, Bjorkman T, Harman GE. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *trichoderma harzianum* rifai 1295-22. Appl Environ Microbiol. 1999;65(7):2926-2933.