

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнології та екології

ПОГОДЖЕНО

**Декан факультету захисту рослин,
біотехнології та екології**

_____ **Юлія КОЛОМІЄЦЬ**

«___» _____ 2026 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач кафедри екобіотехнології та
біорізноманіття

_____ **Олена КВАСКО**

«___» _____ 2026 р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА на тему:

**«Ідентифікація та біологічний контроль *Pectobacterium carotovorum* –
збудника бактеріальних гнилей картоплі із застосуванням ендofітних бактерій
антагоністів»**

Спеціальність «162 біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології та біоінженерія»

Гарант освітньої програми

Кандидат біологічних наук,
доцент

Олена КВАСКО

**Керівник бакалаврської
кваліфікаційної роботи**

Доктор сільськогосподарських наук,
професор

Юлія КОЛОМІЄЦЬ

Виконала

Євгенія АРХІПОВА

Київ – 2026

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнології та екології

**ЗАТВЕРДЖУЮ Завідувач
кафедри екобіотехнології та
біорізнноманіття**

Кандидат біологічних наук, Олена КВАСКО

“ ” _____ 2026 р.

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

Архиповій Євгенії Михайлівні

Спеціальність **«162 біотехнології та біоінженерія»**

Освітньо-професійна програма **«біотехнології та біоінженерія»**

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи

«Ідентифікація та біологічний контроль *Pectobacterium carotovorum* – збудника бактеріальних гнилей картоплі із застосуванням ендоефітних бактерій-антагоністів»

затверджена наказом від «30» жовтня 2025 року № 2569 «С»

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

Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи:

Pectobacterium carotovorum, ізоляти, м'які гнилі, картопля, ідентифікація, *Bacillus amyloliquefaciens*, антагонізм, біоконтроль, препарати міді

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Виділити та культивувати збудників інфекції зі зразків зараженої рослини
2. Ідентифікувати патоген згідно міжнародною класифікацією за допомогою мікробіологічних та фітопатологічних методів аналізу
3. Провести заходи біоконтролю із застосуванням хімічних препаратів та бактерій-антагоністів
4. Визначити межі ефективності досліджених засобів біоконтролю

Дата видачі завдання «1» листопада 2025р

**Керівник бакалаврської
кваліфікаційної роботи**

Юлія КОЛОМІЄЦЬ

Завдання взяв до виконання

Євгенія АРХІПОВА

ABSTRACT

The thesis consists of 50 pages, 9 illustrations and 13 tables, with number of the references cited – 61.

Key words: *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*, WILD ISOLATES, SOFT ROT, *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*, ANTAGONISM, BIOCONTROL,

Aim of the work: investigation of the biotechnological potential of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* 2410 for the biocontrol of *Pectobacterium carotovorum*.

Object of the research – wild isolates *Pectobacterium carotovorum*, isolated from the infected bulbs harvested in Kyiv.

Subject of the research: antagonistic activity *Bacillus amyloliquefaciens*

Methods of the research: experiment, comparison, Koch's postulates, pure culture isolation, numerical analysis, cluster analysis

Relevance of the study: the evaluation of major yield-limiting pathogens which are difficult to identify, is a matter of national food security

Research objective: According to the stated aim a range tasks of have been formulated and addressed

1. Isolation and cultivation of causative agents from the samples of the infected plans
2. Identification of the pathogen according to the international classification using microbiological and phytopathological methods of analysis.
3. Evaluation of the control strategies utilizing chemical compounds and antagonistic bacteria
4. Determination of the effectiveness range of the studied methods

Results and scientific novelty: the obtained results showed that utilizing antagonistic bacteria is an optimal strategy for limiting *Pectobacterium carotovorum*. The scientific novelty consists in the evaluation of the recently discovered antagonistic strain and studying the highly heterogeneous species of the pathogen, the trends in which can be applied given that agriculture is undergoing changes, which include climatic shifts. As the result of the research, the *Bacillus amyloliquefaciens* 2410 strain efficacy was identified which confirms that this bacteria can be further applied for the production of the biotechnological products for the horticulture.

РЕФЕРАТ

Загальний обсяг роботи складає 50 сторінок, кількість ілюстрацій - 9 , таблиць - 13, а використаних джерел - 61.

Ключові слова: *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*, ІЗОЛЯТИ, М'ЯКІ ГНИЛІ, *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*, АНТАГОНІЗМ, БІОКОНТРОЛЬ,

Мета роботи: є дослідження біотехнологічного потенціалу штаму *Bacillus amyloliquefaciens* 2410 у контролі *Pectobacterium carotovorum*.

Об'єкт дослідження - природні ізоляти *Pectobacterium carotovorum*, виділені з уражених бульб зібраних на території Київської області.

Предмет дослідження - антагоністична дія *Bacillus amyloliquefaciens*

Методи дослідження: експеримент, порівняння, постулати Коха, виділення в чисту культуру, нумеричний аналіз, кластерний аналіз

Актуальність дослідження: вивчення важкодiагностованих патогенів, здатних викликати масові втрати врожаю є завданням продовольчої безпеки.

Завдання дослідження. Відповідно до поставленої мети було сформульовано та вирішено низку завдань:

1. Виділити та культивувати збудників інфекції зі зразків зараженої рослини
2. Ідентифікувати патоген згідно міжнародною класифікацією за допомогою мікробіологічних та фітопатологічних методів аналізу
3. Провести заходи біоконтролю із застосуванням хімічних препаратів та бактерій-антагоністів
4. Визначити межі ефективності досліджених засобів біоконтролю

Результати та новизна дослідження: отримані результати показали оптимальність використання антагоністичних мікроорганізмів для біоконтролю *Pectobacterium carotovorum*. Новизна полягає в вивченні нещодавно відкритого штама-антагоніста та аналізі патогену із високою внутрішньовидовою гетерогенністю, тенденції якої можуть бути застосовані в умовах змін у сільському господарстві, зокрема кліматичних.

У результаті дослідження виявлено штам *Bacillus amyloliquefaciens* 2410, який може бути використаний для виробництва біотехнологічних препаратів для рослинництва.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.2 Картопля та інші пасльонові	7
1.3 М'які гнилі	8
1.4 <i>Pectobacterium carotovorum</i>	10
1.5 Принципи ідентифікації.....	13
1.6 Принципи контролю	15
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	17
2.1 Об'єкт дослідження	17
2.2 Метод виділення збудника м'якої гнилі	17
2.3 Штами фітопатогенних бактерій	18
2.4 Штам-антагоніст.....	18
2.5 Умови культивування	19
2.6 Методи мікробіологічного аналізу	20
2.6.1 Мікроскопіювання	20
2.6.2 Фарбування за Грамом	21
2.6.3 Ставлення до кисню.....	21
2.7 Методи фітопатологічного аналізу	21
2.7.1 Мацерація картоплі	21
2.7.2 Надчутливість тютюну	22
2.7.3 Штучне зараження томатів.....	22
2.8 Ідентифікація за використанням тест-систем	23
2.9 Метод визначення чутливості ізолятів до хімічних препаратів	23
2.10 Метод виявлення антагонізму	25
2.11 Метод визначення впливу на рослини	26
2.12 Методи статистичного аналізу.....	26
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	27
3.1 Характеристика симптомів.....	27
3.2 Характеристика виділеного штаму бактерій	28
3.3 Чутливість ФПБ до хімічних препаратів	37
3.4 Чутливість ФПБ до комерційних біопрепаратів	39
3.5 Антагонізм <i>B. amyloliquefaciens</i> 2410.....	39
3.6 Вплив <i>B. amyloliquefaciens</i> 2410 на рослини	40
ВИСНОВКИ.....	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	42

ВСТУП

Одним із серйозних проблем сучасного сільського господарства є м'які гнилі різноманітних овочевих культур - судинні бактеріальні захворювання, які спричиняють активне руйнування рослини та вже зібраного врожаю. Найпоширенішими збудниками м'яких гнилей є роди грамнегативних пектолітичних бактерій *Pectobacterium* та *Dickeya* [1], [2]. Для цієї інфекції властива прихована форма перебігу та незворотність інфекції після виявлення симптомів [3], що робить її одною з найбільш небезпечних бактеріальних хвороб рослин.

Одною з овочевих культур вразливих до цієї хвороби є картопля [4], виробництво якої має стратегічне значення для харчової безпеки багатьох країн, до яких належить і Україна. У 2023 році (востаннє уточнені дані) посівні площі під нею становили 1,2 млн гектарів [5],[6]. При цьому 97,3% посівних площ овочевих і баштанних культур (до яких відноситься і картопля) належать особистим господарствам, які переважно не мають доступу до професійних засобів діагностики, а також сертифікованого вільного від патогену посадкового матеріалу [7] оскільки лабораторні дослідження та підготовані бульби є для них часто економічно недоцільними або логістично недоступними. Така концентрація насаджень без фітопатологічного контролю створює загрозу епіфітотій для хвороб, які перебувають в латентній формі, до яких відносяться і м'які гнилі.

Наявні засоби біоконтролю стикаються з багаторівневими проблемами під час діагностики та моніторингу. Ключовою проблемою діагностики є частий брак симптомів, які дозволили би відбирати зразки для ідентифікації збудника. Також неможливий ефективний масовий скринінг, оскільки заражена рослина може тривалий час не поширювати інфекцію і відбір випадкового зразка не є репрезентативний. Крім цього, до появи симптомів рослина виявляє низьку концентрацію патогену. Масове використання тестів з високою чутливістю

(наприклад, генетичні з виявленням S16 маркерів) не є логістично виправданим через їх високу вартість.

З проблем діагностики впливає проблема біоконтролю. *P. carotovorum* має високу внутрішньовидову гетерогенність [8], [9] внаслідок екологічних адаптацій, що може впливати на ефективність засобів контролю. Навіть дороговартісні тести з високим порогом чутливості обмежені видовою ідентифікацією, яка є філогенетичною, а не екологічною. Ті ж дослідження, які здатні на генетичне розрізнення окремих штамів не є ні поширеними, ні виправданими через високу ціну та тривалість. Відповідно різні ізоляти *P. carotovorum* можуть по різному реагувати на засоби контролю, при цьому діагностика є ускладненою на багатьох рівнях.

Вирішенням цієї проблеми може бути застосування антагоністичних мікроорганізмів, як от *Bacillus amyloliquefaciens*, які здатні перешкоджати життєдіяльності збудників м'яких гнилей до появи симптомів. Внесення культури на поле не потребує попередньої діагностики та є ефективним превентивним методом з мінімальними екологічними ризиками. Крім цього ринок біопрепаратів росте [10], що підтверджує також економічну перспективу розвитку біотехнологічних методів.

Наукова новизна роботи полягає у поглибленні та розширенні даних про антагоністичний потенціал нещодавно описаного штаму *Bacillus amyloliquefaciens* 2410 щодо сучасних природних ізолятів *P. carotovorum* - Актуальність полягає в проблематиці епіфітотій спричинених цим патогеном, а також гетерогенності самого виду, підвиди та штами якого можуть сильно різнитись за ознаками [8], [9], що обумовлює потребу дослідження диких штамів *P. carotovorum*. Причиною вибору біотехнологічних методів є те, що розрізнення таксонів вужче за підвид є доцільним у площині біотехнології та біохімії.

Метою роботи є дослідження біотехнологічного потенціалу штаму *Bacillus amyloliquefaciens* 2410 у контролі *Pectobacterium carotovorum*.

Об'єкт дослідження - природні ізоляти *Pectobacterium carotovorum*, виділені з уражених бульб зібраних на території Київської області.

Предмет дослідження - антагоністична дія *Bacillus amyloliquefaciens* направлена на патоген.

Завдання дослідження. Відповідно до поставленої мети було сформульовано та вирішено низку завдань:

- 1 Виділити та культивувати збудників інфекції зі зразків зараженої рослини
- 2 Ідентифікувати патоген згідно міжнародною класифікацією за допомогою мікробіологічних та фітопатологічних методів аналізу
- 3 Провести заходи біоконтролю із застосуванням хімічних препаратів та бактерій-антагоністів
- 4 Визначити межі ефективності досліджених засобів біоконтролю.

Експериментальна робота виконана у відділі фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України. Результати представлено на українських і закордонних конференціях:

Arkhipova Y., Butsenko L., Kolomiets Y. Antagonistic activity of strain *Bacillus* sp A3 against phytopathogenic, Abstract Book 5th International Conference «Strategies toward Green Deal Implementation Water, Raw Materials & Energy in Green Transition» (27-29 November 2024, Cracow, Poland). P. 134 .

Архіпова Є.М, Коломієць Ю. В., Буценко Л. М. Характеристика штамів фітопатогенних бактерій, ізольованих із уражених м'якою гниллю бульб картоплі, Міжнар. наук.-практ. конф. «Біологічні, біотехнологічні та генетичні аспекти інтенсифікації аграрного виробництва» (Миколаїв, 24-25 жовтня 2024 р.). С.9

Архіпова Є.М. Буценко Л. М. Клітинна морфологія як екологічна перевага фітопатогенних пектобактерій. Досягнення і перспективи в захисті та карантині рослин: матеріали 5 Всеукр. наук.-практ. конф. здобувачів вищої освіти (Київ, 23-24 квітня 2026 р.). Національний університет біоресурсів та природокористування, 2026. (У друці).

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.2 Картопля та інші пасльонові

Картопля належить до цінних сільськогосподарських культур через свою харчову цінність та високу врожайність. Обсяги її вирощування в світі поступаються лише зерновим культурам (наприклад, пшениці, рису кукурудзі та іншим) [2]. Одночасно саме нутріціологічна цінність може збільшувати вразливість рослин до епіфітотій через потребу патогена в поживних речовинах, а також є сприятливим чинником перебігу хвороби [11]. Відповідно особливості картоплі забезпечують умови поширення фітопатогенів. Існують сорти картоплі з підвищеною стійкістю до загнивання [12], однак ведеться робота по створенню стійкіших сортів.

Сучасна селекція картоплі для стійкості проти м'яких гнилей спрямована на покращення фізичних та метаболічних механізмів захисту. Одним із фізичних захистів є бар'єрна властивість поверхневих тканин картоплі, і картопля з міцнішою шкіркою є кращою за картоплю з тонкою. Також іде розробка покращених сортів, яка спирається на знання про власні біохімічні механізми захисту картоплі. Картопля має системи захисту від м'яких гнилей, які сукупно становлять рослинний імунітет. До вродженого рослинного імунітету включають шляхи саліцилової та жасмонової кислоти, а також етилен-опосередкований захист. Метаболічний шлях залежить від етапу інфекції [1]. Рослинний імунітет активується у відповідь на специфічні молекули, які притаманні як патогену (PAMPs), так і процесам, які він спричиняє (DAMPs) [13]. Наприклад, рослина може активувати метаболічні захисні шляхи у відповідь на олігогалактуроніди - речовини які утворюються внаслідок реакції розщеплення пектину бактерією. [1].

Таким чином, рослина реагує на наявність збудника та шкоду, яку він спричиняє. Уся сукупність механізмів власного рослинного імунітету може бути використана при розробці нових сортів картоплі.

1.3 М'які гнилі

М'які гнилі (також вживається термін “мокрі гнилі”) це незворотні хвороби рослин бактеріальної природи. Їхня головна небезпека полягає в неможливості ранньої діагностики та стрімкий розвиток уражень після виявлення симптомів - коли шкода вже є необоротною і наступні дії здебільшого зводяться до мінімізації збитків [1], [12]. Особливості хвороби обмежують заходи боротьби до превентивних (контроль та профілактика) та реакційних (карантин) [2].

Збитки, які спричиняються м'якими гнилями, варіюються. До них можуть належати гірші показники врожаю через сповільнення росту, менший обсяг плодів, втрати товарного вигляду бульб. Серед збитків може бути повна загибель кущів, значна втрата зібраного врожаю на полі та після збору, а також потреба в карантинних заходах. [12], [14]. Варто зазначити, що карантин сам по собі може бути джерелом неодержаних доходів через втрату можливості використовувати землю. Саме ця варіативність шкоди разом із проблематичністю ідентифікації робить патоген комплексною загрозою з непередбачуваними наслідками.

Ключ до розуміння наслідків та боротьби із інфекцією лежить у її патогенезі, який відрізняється залежно від місця ураження, погодних умов та форми хвороби - пагонової або бульбової.

У пагоновій формі патоген проникає в організм картоплі переважно через механічні ушкодження поверхонь. Після проникнення бактерії можуть довго перебувати без спричинення симптомів до настання сприятливих умов, що може зайняти тижні та місяці [1]. У цей час візуально рослина виглядає неураженою, і якраз це створює проблему репрезентативності, яка сильно ускладнює діагностику.

Згідно із сучасними дослідженнями у період латентної фази *P. carotovorum* поводить ся як біотрофний патоген [15]. У вразливих сортів бактерія колонізує внутрішню поверхню судин, утворюючи біоплівку, а у стійких не здатна до адгезії та перебуває в протопласті як вільноплаваючий мікроорганізм. [16]. Зіставлення цих даних дозволяє зробити припущення, що захист судин

спирається на анатомію рослини не лише в площині стійкості до механічних пошкоджень, а також характері поверхні та її інертності.

Для пагонової форми першими симптомами є в'янення внаслідок закупорки судин [9], [17], зміни кольору та водянисті виразки та ексудат із подальшим ослизненням поверхні листків [18]. Коли колонія патогену значно заселяє внутрішні органи бактерія починає некротрофний процес. Руйнування зрештою спричиняє колапс тканин [1]. Ще одним шляхом проникнення є кореневий із подальшим проникненням судинами нагору [9]. Цей шлях зараження може призводити як до пагонової, так і до бульбової форми.

Бульбова форма розвивається на початку бульбоутворення [12]. Це може відбуватися як раневим шляхом так і крізь сочевички [19]. Як зазначає Bethke, 2023 сочевички з часом вкриваються захисним шаром суберину, який у молодих бульб може становити 10-70 мкм, а у зібраних 165-230. Це дозволяє припустити, що якраз тонкий бар'єрний шар сочевичків робить рослину вразливою до ураження саме на початку бульбоутворення.

Якщо раневий шлях ураження починається з травмування поверхні рослини, якого гіпотетично можна уникнути, то бульбова форма є додатково небезпечною тим, що патоген використовує нормальну анатомію організму.

Латентна стадія в у бульбовій формі вважається більш пасивною за перебігом. Фундаментальні дослідження як от Pérombelon, 2002 [20] припускали роль ендofітної мікробіоти бульб, що підтверджують сучасні дослідники, серед яких Kurm et al., 2024. Останні виявили зв'язок між складом мікроорганізмів в бульбі та стійкістю до м'яких гнилей, зокремі спричиненими *P. carotovorum*.

Бульбова форма у некротрофній стадії характеризується мацерацією, яка може призводити до повного загнивання - стану кашоподібної маси [17]. Через роз'єднання клітин внаслідок руйнування *P. carotovorum* середньої ламели - багатого на пектин шар клітин, який виконує інтеграційну функцію об'єднуючи клітини в тканину. Кашоподібна маса на останньому етапі хвороби - це окремі клітини, які втратили цементуючу речовину та виглядають як слиз [14], [18]

Перебіг хвороби для обох форм різниться через умови навколишнього середовища. У вологих прохолодних локаціях рослина схильна до суцільного ослизнення, у теплих - в'янення, пожовтіння та зближення листя на верхівці. Натомість у теплих районах без опадів рослина схильна до латентного перебігу ураження [12]. Погодні чинники найбільше впливають під час вегетації. [18]. Причина цьому найімовірніше криється в механізмі ураження картоплі, а саме ослабленні її під час браку біодоступного кисню [7]. Рослина під час вегетації потребує активного метаболізму, і його пригнічення у період вегетації мають довгострокові негативні ефекти. Таким чином, рослина, яка була уражена в етап найбільшого розвитку відстає від неуражених рослин та схильна до важчого перетікання інфекції та гірших наслідків.

Джерела інфекції є різноманітні. Ним може бути рослинний матеріал (посадковий матеріал, сусідні кущі, зібраний врожай, минулорічні рослинні решки в ґрунті), сам ґрунт, комахи та реманент. Саме потрапляння може відбуватись як крізь раневі ушкодження, так і місця контакту з іншими патогенами, наприклад виразки спричинені *Phytophthora infestans* [1],[18].

Наразі ефективного лікування м'яких гнилей не існує [21].

1.4 *Pectobacterium carotovorum*

P. carotovorum належить до фітопатогенних бактерій та є збудником м'яких гнилей картоплі. Вид входить до родини *Pectobacteriaceae* (споріднена з *Enterobacteriaceae*) і раніше був відомий як *Erwinia carotovora*. Має широкий спектр господарів, серед яких пасльонові, хрестоцвіті, селерові та гарбузові [22].

За морфологічними ознаками це грамнегативна паличкоподібна, неспороутворююча рухома перитрихальна бактерія. [9], [23], [24].

Бактерії переважно поодинокі, хоча інколи можуть утворювати ланцюги [25]. Натомість деякі інші види, які утворюють біоплівки, зокрема *B. subtilis*, активно утворюють ланцюжки та виділяють секрет для покращення прилипання [26], [27]. У той же час поодинокі бактерії *P. carotovorum* приєднуються до поверхні за допомогою джгутиків переважно долаючи її опір, хоча також

синтезують позаклітинні полімери для адгезії [28]. Можливо, утворення ланцюжків є стратегією, яка забезпечує більш непомітну латентну фазу захворювання, оскільки сукупність бактерій може виділяти більшу кількість прилипачів, які зменшують потребу в агресивному причепленні до субстрату.

Вона є відносно невеликою ($0,6-0,5 \times 1,7-2,5$ мкм) [22], однак здебільшого не може проникати крізь неукшкоджені поверхневі шари рослини, крім переважно молодих бульб. Натомість вона виробляє ферменти, які руйнують клітинну стінку рослин створюючи доступ до внутрішніх тканин господаря. До таких ферментів належать пектинази, целюлази, протеази, полігалактуранази, ксиланази, пектат ліази [9], [23]. За ставленням до температури *P. carotovorum* належить до мезофілів, з найбільшою активністю за температури 28-32°C, водночас слабшу активність ніж при 24°C та особливо 37°C, за якої пектолітичні ферменти зазнають руйнування [29].

За трофічними ознаками *P. carotovorum* – гемібіотроф [15], тобто має два типи живлення залежно від стадії патогенезу. На ранній стадії інфекції *P. carotovorum* вважається біотрофом та опортуністичним патогеном. Натомість, на пізньому етапі патоген переходить в агресивну фазу та діє як некротроф - починає активно споживати поживні речовини організму-господаря, які вивільнились після ензиматичного розщеплення оболонки клітин [18]. Подвійний характер патогена описує його адаптивність, конкретні механізми якої буде розглянуто надалі.

За типом метаболізму це факультативний анаероб [1], що надає патогену перевагу над вищими рослинами, особливо картоплі. Це надає *P. carotovorum* перевагу у середовищі, із браком кисню, на відміну від картоплі. Картопля вразлива до локального надлишку вологи через блокування шляхів надходження кисню та розчинення його у воді. Хоча гіпоксія сама по собі робить рослину робить вразливою до ураження, патогени не лише вражають найбільш ослаблені кущі, а здатні на посилення негативних ефектів [7], тому стан гіпоксії картоплі є сприятливою умовою для зараження

Механізм використання гіпоксії рослини засновується на тому, що збудники м'яких гнилей здатні реагувати на адаптацію рослин до абіотичних стресорів. Коли рослина виділяє речовини-адаптогени, бактерія сприймає це як сигнал до вивільнення вірулентних факторів із токсичним впливом [23]. До них належать вторинні месенджери, зокрема циклічний дигуанілат. [7]

Крім попереднього прикладу, екологічна стратегія *P. carotovorum* в цілому спирається на різноманіття метаболічних шляхів пристосованих до сприйняття змін у навколишньому середовищі [1]. Вивільнення ферментів координується транскрипційними і потстраскрипційними факторами у складній мережі регуляторних білків чутливих до навколишніх сигналів. Бактерія здатна системно сприймати такі сигнали як погодні умови, біохімічні маркери рослин та фізіологічні процеси інших мікроорганізмів [23].

Саме ця чутливість до чинників навколишнього середовища може бути причиною екологічного успіху *P. carotovorum*. Патоген здатний реагувати як на стан картоплі так і на готовність колонії (через відчуття кворуму) спрямовано починати скоординовану мацерацію тканин-господаря в найкращих умовах для мікроорганізму.

Бактерії здатні до відчуття кворуму - узгодження між станом окремих бактерій та скоординована зміна поведінки. Досягається реакцією між сигнальними молекулами (наприклад, N-ацил гомосерин лактонами) та білками, які регулюють експресію білків. Зв'язок може бути антагоністичним та стимулюючим, а реакції як миттєвими так починатись після досягнення певного титру. Мутанти, позбавлені цих сигнальних молекул мають значно меншу вірулентність [23], що підтверджує їх ключову роль для екологічної переваги *P. carotovorum*. Вид належить до сильно вірулентних та стійких патогенів [30], що доводить екологічну та еволюційну перевагу перелічених засобів тонкої адаптації до навколишнього середовища та стану як рослини-господаря та динаміки розвитку самої бактеріальної колонії.

1.5 Принципи ідентифікації

Методи ідентифікації м'яких гнилей можна поділити на дві великі групи - мікробіологічні та молекулярні, однак жоден із окремих методів не є універсальним. Вибір оптимальної стратегії залежить від мети дослідження та може включати в себе обидва методи.

Першим історично та процедурно є мікробіологічний рівень діагностики. Основний принцип покладений в мікробіологічну діагностику це спільність біохімічного та морфологічного профілю виду. Біохімічні аналізи, ставлення до поживного середовища та світлова мікроскопія відображають фундаментальні властивості метаболізму мікроорганізму, які покладені в таксономію виду. Однак ця кореляція є недостатньо точною для диференціації на внутрішньовидовому рівні (підвид, штам, патовар тощо). Актуальність цього підходу підтверджується сучасними працями, серед яких є як підручники Schumann & D'Arcy, 2021, так і наукові статті Nawar & Al-Juboory, 2023

Золотим стандартом визначення на рівні штаму є генетичні дослідження із можливістю аналізу генетичних маркерів та вузькоспецифічних особливостей метаболізму, різниця між якими не є помітною на рівні мікробіологічних показників. Доцільність застосування окремого виду залежить від поставленої наукової задачі. Розробка методів біоконтролю в біотехнології здебільшого потребує лише видового визначення, оскільки спрямована на спільні як для виду, так і для родини ознаки. Для розробки технології для масового споживача варто також враховувати реальні економічні можливості агросектору, значну частину якого складають господарства населення (наприклад, 97% виробників картоплі у 2023 за даними Держстату), які можуть мати обмежений доступ до лабораторної діагностики.

Schumann & D'Arcy, 2021 зазначають, що рутинно можна застосовувати мікробіологічні ознаки, як от грам-реакція, рухливість, ріст на селективних середовищах та реакція на кисень. Більш сучасні дослідження, такі як Nawar & Al-Juboory, 2023 також доводять актуальність біохімічних та мікробіологічних

методів ідентифікації, оскільки згідно концепції їх дослідження фенотип є прямим вираженням генотипу та обґрунтовано залишається надійним принципом визначенням видової приналежності.

Крім принципів застосування також варто виділити біологічний фундамент, закладений у таксономію. Таксономічний аналіз, що базується на мікробіологічному методі охоплює вивчення морфології та метаболізму мікроорганізмів. До першої належить форма, розмір, рухливість, культуральні та тинкторіальні властивості.

Визначення типів метаболізму досліджуваного ізоляту засновується на визначенні реакцій, які забезпечують мікроорганізму специфічну екологічну нішу. Переважна більшість таких реакцій перевіряє ставлення до кисню та здатність ферментативно розщеплювати субстрат. Залежно від комбінації типів біохімічної взаємодії із навколишнім середовищем мікроорганізми складають різні групи, які пройшли процес тривалий адаптації та підбору оптимальної стратегії взаємодії з ресурсами. Власне, саме ці еволюційні розгалуження, закріплені в метаболізмі, і визначають межі таксонів.

Наразі існують спеціальні тест-системи із специфічними субстратами, здатність метаболізувати які є маркерною. Такі системи є зручною формою багатьох маленьких з'єднаних пробірок, до які додають культуру та перевіряють зміну кольору асоційовану з наявністю або відсутністю якісної реакції.

До маркерних ферментів належить уреаза. Наявність гену уреазу забезпечує здатність розщеплювати сечовину та змінювати рН навколишнього середовища, що є одночасно способом живлення та конкуренції. У цьому випадку маркерний фермент визначає спосіб колонізації [31]. Робота з пошуку нових таксономічно маркерних ферментів може тривати, і потенційно в майбутньому способи біотехнологічної ідентифікації патогенів розширяться.

1.6 Принципи контролю

М'які гнилі спричинені *P. carotovorum* та *Dickeya* належать до одних із найпоширеніших карантинних бактеріозів рослин Європи [32]. Принципи боротьби спираються на механізми патогенезу, які забезпечують успіх бактеріозу.

Навіть незначна кількість уражених зразків може призвести до втрати продукції [21], оскільки брак заходів спостереження робить будь-яке ураження потенційно масовим без видимих ознак. При цьому ознаки масового ураження з великою імовірністю не будуть помітні до початку візуальних проявів, на етапі коли симптоми уже необоротні.

Крім проблематики виявлення, боротьба з м'якими гнилями є галуззю, яка потребує досліджень та інновацій, оскільки наразі не існує безпосередніх засобів протидії [21]. Крім цього, внаслідок змін клімату патогенез *P. carotovorum* також змінюється.

Еволюційні механізми захисту були пристосовані до умов, які існували раніше. Зміни клімату (актуальні також і для України [33]) руйнують сталі екологічні зв'язки, що часто може вести за собою поширення невластивих до того патогенів [34]. У контексті картоплі варто зазначити, що кліматичні зміни можуть опосередковано спричиняти гіпоксію, основним чинником якої є збільшення вологості, яка має тенденцію до зростання в окремих регіонах [7], [35]. Тому існує необхідність регуляції рівня вологості та аерації насаджень та бульбосховищ. Брак ефективного лікування і змін у фітопатологічній ситуації створює потребу створення найоптимальніших стратегій в обмежених умовах.

Згідно з рекомендаціями ЕРРО ідентифікації спираються на взаємодоповнення різних підходів. Інтегрований підхід включає в себе профілактичні та карантинні заходи, а також виведення нових стійких сортів. Варто зазначити, що актуальною є розробка засобів сповільнення та пригнічення наявної інфекції, однак станом на 2026 ці методи є переважно експериментальними. Традиційна профілактика полягає у виведенні нових стійких сортів, використання незараженого посадкового матеріалу, озеленення

бульб, регулярна сівозміна із чергуванням вразливих та захищених культур, профілактичне застосування хімічних засобів і біопрепаратів, за потреби ізоляція уражених кущів і врожаю, карантинні заходи [14]. Також можливе застосування антибіотиків (стрептоміцин, амоксицилін, цефалотин) [14],[25], однак цей метод створює суттєві ризики екологічної безпеки.

Стійкість сортів передбачає посилення імунної відповіді та зміцнення бар'єрних структур. Якість посадкового матеріалу внаслідок природної стійкості або знезараження є одним із ключових принципів, оскільки основне зараження переважно відбувається на етапі насіння [21]. Оскільки бульби як посадковий матеріал та врожай є джерелом інфекції, крім вироблення стійких бульб, також важливо знезаражувати робочий інструмент і забезпечувати акуратний збір врожаю для уникнення пошкоджень [18]. Крім цього для уникнення зараження бажано садити нерізані бульби [22]. Суть підходу полягає в тому, що навіть стійкий до механічних уражень сорт не є імунним до грубих ударів та активних концентрованих джерел інфекції.

Серед культур, після яких радять висаджувати картоплю є зернові, бобові та зернобобові культури, які виявляють бактерицидну дію. [14]. Усі перелічені культури мають симбіотичні зв'язки з бактеріями [36], [37], [38], що дозволяє припустити, що саме симбіотична мікробіота пригнічує розвиток *P. carotovorum*.

Це припущення також може ґрунтуватись на дослідженнях про роль мікробіоти як фундаментального чинника перебігу інфекції [21].

Крім опосередкованого впливу через планування сівозмін із культурами, асоційованими із бактерицидною дією, також існує метод прямого застосування мікроорганізмів у вигляді біопрепаратів. Зазвичай до складу біопрепаратів входять ендofітні бактерії або надпаразити, що вже довели свою ефективність в природних екосистемах.

Одним із найпоширеніших мікроорганізмів для боротьби з м'якими гнилями є рід *Bacillus*, види *B. subtilis* та *B. amyloliquefaciens*.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Об'єкт дослідження

У роботі було використано ізоляти збудників м'яких гнилей картоплі (*Solanum tuberosum*), отримані з візуально уражених бульб картоплі зібраної на території фермерського господарства Київської області. Візуально уражені рослини виявляли специфічні для м'яких гнилей симптоми. Ізолятам було присвоєно номери 2411, 2412 та 2413. Ідентифікацію виділених ізолятів проведено за комплексом морфолого-біохімічних ознак згідно з класифікацією Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Культури підтримуються в робочій колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного.

2.2 Метод виділення збудника м'якої гнилі

Виділення збудника м'якої гнилі проводили за протоколами описаними у монографії про методи дослідження фітопатогенних бактерій авторства Патики та співавторів [39]. Для отримання первинних ізолятів використовували бульби з ознаками ураження. Поверхню бульб ретельно промивали проточною водою, очищуючи від залишків бруду. У ламінарному боксі промиту бульбу нарізали на скибки профламбованим скальпелем. Матеріал для виділення відбирали в ділянці судинного кільця на межі між здоровою та ураженою тканиною. Фрагменти тканини розміром близько 1 см³ (Рис. 2.1), переносили і гомогенізували у фарфоровій ступці, попередньо обробленої спиртом та стерилізованої над полум'ям спиртівки. Отриманий рідкий гомогенат засівали на чашки Петрі із щільним картопляним агаром методом суцільного газону



Рис 2.1 Відібрані фрагменти на межі з ураженою тканиною

Після інкубації первинної культури було відібрано колонії із характерним виглядом. Відібрані колонії переносили на нове поживне середовище для отримання чистої культури. Виділення проводили методом вичерпного штриха для розрідження і отримання окремих колоній на поверхні агару. Спочатку на невеликій ділянці середовища (близько 1/5 поверхні) проводили щільний засів безперервним штрихом, наносячи біомасу не відриваючи бактеріальну петлю з поверхні агару. Потім, після вичерпання біомаси на петлі, проводили один суцільний широкий хвилястий штрих по вільній поверхні середовища. Така техніка дозволяє зменшити кількість клітин на петлі для того, щоб засівати основний штрих меншою концентрацією бактерій, які утворюють окремі незлиті колонії. У подальшому перед початком кожного експерименту отримували свіжу культуру після 24 годин інкубації на новому поживному середовищі.

2.3 Штами фітопатогенних бактерій

Штами отримано з колекції штамів відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного (Таблиця 2.1)

Таблиця 2.1 - Перелік використаних штамів

Вид мікроорганізму	Номер штаму	Міжнародні синоніми / Статус
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	8982	Типовий штам ATCC 15713
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	7136	Ізольовано в Україні
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	8682	Ізольовано в Україні
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	9038	Типовий штам
<i>Pseudomonas syringae</i>	8511	Типовий штам
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	8573	Ізольовано в Україні
<i>Xanthomonas campestris</i>	80036	Ізольовано в Україні
<i>Xanthomonas</i> sp.	9098	Ізольовано в Україні

2.4 Штам-антагоніст

Походження та ідентифікація штаму

B. amyloliquefaciens 2410 – раніше ізольовано як ендофіт з насінневих бруньок квіток чорного пасльону (*S. nigrum* L.) та ідентифіковано як *Bacillus amyloliquefaciens* у дослідженні Borodai et al., 2022 [40]. Вибір даного штаму для

роботи зумовлений його вираженою антагоністичною активністю стосовно фітопатогенних мікроорганізмів, зокрема виду *P. carotovorum*.

Морфологія та екологія

Морфологічно *B. amyloliquefaciens* є грампозитивною [41] ендofітною спороутворюючою паличкоподібною бактерією. За ставленням до кисню є аеробом. Утворює стійкі різноманітні біоплівки, на твердих поверхнях живих організмів та абіотичного походження, а також у повітряно-рідинних середовищах [42] Екологічно належить до ґрунтових мезофільних бактерій.

Механізми антагоністичної дії

Антагонізм досягається комплексом засобів. Видоспецифічним є порушенням комунікації фітопатогенів завдяки пригніченню їх сигнальних молекул. Крім екологічного антагонізму *B. amyloliquefaciens* виявляє пряму антибактеріальну дію, синтезуючи антибіотики [40]. Додатково вид здатний стимулювати системний захист рослин [7] та посилювати їх ріст завдяки фіксації азоту і синтезу регуляторів росту [40].

Ферментативний потенціал та аспекти патогенності

Наявність ряду ферментів (пектинази, целюлази, амілази), що спричиняють деградацію рослинного матеріалу, обумовлює здатність викликати псування харчових продуктів [43], що певним чином відносить *B. amyloliquefaciens* до умовно шкідливих мікроорганізмів, що однак нівелюється вираженим антагонізмом до інших патогенів харчових продуктів.

Попри це *B. amyloliquefaciens* одночасно виявляє сильну антагоністичну дію до патогенів харчових продуктів так і патогенів рослин [44], [45] Не є збудником хвороб людини.

2.5 Умови культивування

Склад та підготовка поживних середовищ

Для вирощування та підтримання культур використовували картопляний агар і картопляний бульйон. Підготовку середовищ здійснювали згідно з протоколами викладеними у праці В. П. Патики та співавторів [39]. Для

отримання картопляного агару вимиту та почищену картоплю варили у киплячій воді у пропорції 500 грам на 1 літр протягом 15 хвилин. Також у суміш додавали 20 грам агар-агару та 5 грам NaCl. Отриманий відвар проливали крізь марлево-ватний фільтр і доводили до початкового об'єму 1 літр. Приготування завершувалось після розплавлення агару та коригування середовища до pH 7,2. Картопляний бульйон - модифікація картопляного агару готували ідентичним методом, але без додавання агар-агару. Обидва типи середовищ стерилізували автоклавуванням за температури 120°C впродовж 30хв

Режими інкубації та інокуляції

Для підтримання чистої культури та морфологічного контролю застосовували чашки Петрі та мікробіологічні пробірки з косим агаром. Усі культури інкубували у термостаті за температури 27-28°C. З метою інокуляції застосовували перенесення культури методом змиву до фізіологічного розчину, а також стерильної водогінної води.

2.6 Методи мікробіологічного аналізу

Використані методи мікробіологічного аналізу виконані за регламентованими методичними рекомендаціями [39].

Культуральні властивості колоній вивчали спостереженням за характером росту культури на поверхні твердого картопляного агару в чашках Петрі.

2.6.1 Мікроскопіювання

Дослідження морфології бактерій проводили за допомогою світлового мікроскопу Sigeta. Вибір режиму збільшення залежав від щільності мазка та представлений у Таблиці 2.2.

Таблиця 2.2 - налаштування параметрів збільшення мікроскопа

Режим роботи	Об'єктив	Окуляр	Збільшення
Загальне збільшення	40х	16х	640х
Імерсійне збільшення	100х	16х	1600х

Фарбування за Грамом здійснювали із фіксованим зразком. Спостереження за живими клітинами виконували методом “роздавленої краплі”. Для цього на

знежирене та стерилізоване предметне скло наносили краплю стерильної водогінної води, в якому розчиняли бактеріальну біомасу і розтирали її по поверхні скла до утворення однорідного тонкого препарату. Після цього на рідину наносили покривне скло.

Для мікроскопіювання застосовували добову культуру та щойно зроблений препарат.

2.6.2 Фарбування за Грамом

Фарбування за Грамом здійснювали за стандартним протоколом. Знежирене у спирті скельце стерилізували над полум'ям пальника і наносили краплю стерильної водогінної води. Біомасу зразка розтирали у краплі за допомогою бактеріальної петлі і закріплювали мазок над полум'ям. Надалі наносили розчин генціанфіолету (2 хв), після цього розчин Люголя до почорніння, потім знебарвлювали препарат спиртом і додавали сафранін на знебарвлену поверхню. Залишки незакріплених барвників змивали водогінною водою.

2.6.3 Ставлення до кисню

Ставлення до кисню перевіряли за допомогою класичного OF тесту із застосуванням вазеліну. Для цього у дві пробірки додавали напіврідке середовище Х'ю-Лейфсона зеленого кольору. До обох пробірок додавали бактеріальну культуру. Після цього в одну з пробірок додавали шар (1-2 см) вазелінової олії, яка не пропускає повітря. Облік результатів проводився за одну добу. Перетворення середовища на жовтий колір значило позитивний результат, а збереження зеленого кольору - негативний.

2.7 Методи фітопатологічного аналізу

2.7.1 Мацерація картоплі

Картопля для дослідження була зібрана на території Черкаської області та була візуально здоровою.

Перед початком роботи бульби ретельно промивали у водогінній воді та очищували від шкірки. Після цього очищену картоплю дезінфікували в 70% спирті і стерилізували над полум'ям пальника до втрати блиску та появи матового

відтинку. Підготовлені зразки нарізали стерильним скальпелем на скибки 1-1.5 см.

Отримані зрізи переносили по дві скибки на чашки Петрі з фільтрувальним папером змоченим у стерильній водогінній воді. Одна зі скибок була контрольна - на неї наносили стерильну воду в районі судинного кільця. Іншу інокулювали добовою бактеріальною культурою.

Чашки Петрі культивували впродовж доби за температури 27°C. Стан мацерації фіксували на першу та другу добу, записуючи ступень за шкалою: відсутність змін (-), незначне розм'якшення (+-), сильна мацерація (+).

2.7.2 Надчутливість тютюну

Перевірку здатності штамів викликати реакцію надчутливості проводили із застосуванням індикаторної рослини - куща тютюну (*Nicotiana tabacum*), у якого обирали здорові м'язисті листки із вираженим жилкуванням.

Для реакції надчутливості тютюну брали добову культуру та розчиняли її в 5 мл стерильної водогінної води. Отриману суспензію переносили в шприци для ін'єкцій об'ємом 1 мл.

Для уникнення значних пошкоджень під час інокуляції голку шприца акуратно прикладали до міжвузля на внутрішній частині листка та повільно вводили суспензію до отримання темної плями 2-2.5 см у діаметрі. Контроль проводили зі стерильною водогінною водою в аналогічні ділянки листка.

Облік результатів проводили впродовж 24 годин. Позитивною реакцією (+) вважали появу зони некрозу. Відсутність змін або локальні незначні точкові сліди з аналогічним виглядом на контрольних уколах фіксували як негативний результат (-).

2.7.3 Штучне зараження томатів

Штучне зараження томатів проводили для комплексної оцінки вірулентності ізолятів, а саме дослідження спектру господарів, здатність до долання локального імунітету та спричинення системної інфекції. Для цього застосовували різні частини куща томату.

Дослідження на незрілих маленьких зелених плодах проводили для вивчення пектолітичної активності культур в умовах із посиленням локальним

імунітетом. Для цього (титр 10^7 КУО/мл за стандартом мутності) вводили крізь шкірку плода. Облік результатів проводили впродовж тижня. Негативним (-) результат вважався за відсутності змін, крім точкової зміни кольору внаслідок механічного проколу. Позитивний (+) результат фіксували за появи нового забарвлення, розм'якшення та специфічного запаху.

Для перевірки здатності викликати системну інфекцію пагін цілісного куща інокулювали в міжвузлях. Облік результатів проводили за тиждень після інокуляції. Появу симптомів категоризували як позитивний (+) результат, а їх відсутність як негативний (-).

Результати обох досліджень класифікували також стосовно здатності ізолятів інфікувати спектр господарів.

2.8 Ідентифікація за використанням тест-систем

Для проведення біохімічних аналізів використовували комерційну систему діагностики ENTERO Well D-One (CPM-SAS, Італія), призначену для ідентифікації грам-негативних оксидазно-негативних бактерій родини *Enterobacteriaceae*, яка споріднена з *Pectobacteriaceae* та має подібний метаболізм, що дозволяє визначати бактерії за однаковими маркерними ферментами. Система містить 10 панелей для хімічних тестів на розщеплення лактози, декарбоксилювання амінокислот (аргінін, лізин, орнітин), використання цитрату, продукцію сірководню, уреазну активність, утворення індолу, реакцію Фогеса-Проскауера (утворення ацетоїну), ферментацію цукрів (глюкоза, маніт, інозит, сорбіт, сахароза, арабіноза). Тестування було виконано згідно з інструкцією виробника

Належність до таксону визначали згідно з Визначальника бактерій Берджі

2.9 Метод визначення чутливості ізолятів до хімічних препаратів

Чутливість ізолятів до інгібуючої дії агропрепаратів визначали методом порівняння оптичної густини, яку вимірювали за допомогою спектрофотометра (МІКРОКОЛОРИМЕТР МКМФ-1) за довжини хвилі 540 нм. Характеристику та концентрацію використаних хімічних препаратів наведено в Таблиці 2.3.

Таблиця 2.3 - Характеристика використаних у роботі хімічних препаратів

Назва	Діюча речовина	Принцип дії	Концентрація	Призначення	Виробник
Чемпіон*	гідроксид міді	контактний, профілактика	20 г / 500 мл д.в.	бактеріози	Nufarm [46]
Світч*	флудиоксоніл і ципродиніл	контактно- проникаючий, профілактика і лікування	10 мл / 500 мл д.в.	Мокра та сіра гніль	Syngenta [47]
Парацельс **	флутріафол	системний, профілактика і лікування	4 мл / 400 мл д.в.	грибні хвороби рослин	Сімейний сад [48]
Медян*	хлорокис міді	контактний, профілактика	20 мл / 500 мл д.в.	бактеріози	Sumi agro [49]
Ефатол*	фосетил алюмінію	системний, профілактика і лікування	10 г / 500 мл д.в.	грибні хвороби рослин	Limin Chemical Co [50]

*Препарати включені як внесені Державного реєстру пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні [51]

** Препарати включені за діючою речовиною, що має державну реєстрацію

Дослідні групи формували за схемою у Таблиці 2.4

Таблиця 2.4 - Дизайн експерименту

Група	Компоненти системи у пробірці			Кількість повторів	Призначення
	КБ	Суспензія	Препарат		
Дослід (Д)	9 мл	0.5 мл	0.5 мл	3	Пригнічення росту
Контроль росту (К1)	9 мл	0.5 мл	-	3	Контроль росту штаму
Контроль препарату (К2)	9 мл	-	0.5 мл	3	Калібрування приладу
Контроль середовища (К3)	10 мл	-	-	3	Калібрування приладу

Для проведення дослідження використовували рідке середовище картопляний бульйон та комерційні агропрепарати розчинені у стерильній дистильованій воді у зазначених концентраціях. Добову бактеріальну культуру, а

також усі контролі інкубували впродовж доби. Облік проводився на наступний день із застосуванням спектрофотометричного методу. Вміст пробірок групи К1 поміщували у кювету спектрофотометра для отримання точки нуль. На основі калібрування отримувались значення контролів К2 та К3, метою яких було коригування результатів у випадку наявності власного кольору препарату або суспензії для уникнення похибки. Основні результати фіксувалися приладом за значенням різниці оптичної густини групи Д та групи К1.

2.10 Метод виявлення антагонізму

Антагонізм *B. amyloliquefaciens* 2410 щодо природніх ізолятів. Антагоністичну дію штаму *B. amyloliquefaciens* 2410 та комерційних біопрепаратів (Таблиця 2.5.) щодо ізолятів 2411, 2412, 2413 перевіряли методом перпендикулярного штриха. Оцінку проводили за вимірюванням зон затримки росту. На кожен ізолят припадало три повторності. Облік проводили вимірюванням діаметру зон затримки росту фітопатогенних ізолятів. Для перевірки ефективності інгібування комерційних препаратів спершу проводили їх активацію шляхом інкубування на поживному середовищі картопляного агару.

Таблиця 2.5 - Характеристика використаних у роботі біопрепаратів

Назва	Біологічний агент	Призначення за інструкцією	Виробник
Фітохелп	<i>Bacillus velezensis</i>	бактеріози	БТУ-центр [52]
Фітодоктор СТАРТ	<i>Bacillus subtilis</i> та продукти їх метаболізму (фітогормони, амінокислоти, антибіотики)	бактеріози	ДП “Ензим” [53]
Фітодоктор лист	<i>Bacillus subtilis</i> та продукти їх метаболізму (фітогормони, амінокислоти, антибіотики)	бактеріози	ДП “Ензим” [54]
Фітоцид	<i>Bacillus velezensis</i> (<i>Bacillus subtilis</i>)	бактеріози	БТУ-центр [55]
Бітоксисацілін	<i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>thuringiensis</i> , ендоспори	шкідники	БТУ-центр [56]
Viridin (триходермін)	<i>Trichoderma spp.</i> та продукти метаболізму	Грибні хвороби	ДП “Ензим” [57]

2.11 Метод визначення впливу на рослини

Ріст-стимулюючу дію перевіряли додаванням бактеріальної суспензії штаму *B. amyloliquefaciens* 2410 до вологої камери з насінням різних видів рослин (пшениці), для кожної з яких враховували довжину і вагу для пагонів та коренів. Насіння попередньо ретельно промивали в ситі під водогінною водою впродовж 10 хв, а перед перенесенням у вологу камеру занурювали в стерильну водогінну воду. Промите насіння занурювали на 5 хв у суспензію із розведенням 1:50, 1:100, а також у контроль зі стерильною водогінною водою. На кожне розведення та контроль припадало три повторності. Чашки перебували в темряві до проростання. Облік результатів проводився на 7 добу. Заміри для обліку результатів проводили за допомогою лінійки та електронних вагів.

2.12 Методи статистичного аналізу

Облік результатів та прості обчислення проводили в Microsoft Excel, для аналітики та візуалізації даних використовували GraphPad Prism, а побудову дендрограм виконували в PAST. У роботі застосовували методи варіаційної статистики, а також засоби нумеричної таксономії. Якісні характеристики ізолятів вивчали за допомогою порівняння між еталонними штамми. Ступінь подібності оцінювали за коефіцієнтом Жаккара. Матрицю подібності переводили в дендрограму методом UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Усі кількісні дослідження проводили в трикратній повторності, статистичну значущість яких оцінювали за t-критерієм Велча (через гетерогенність вибірки) з розрахунком p-value. На графіках вираховували стандартну похибку середнього. Аналіз та візуалізацію даних проводили в середовищі GraphPad Prism.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1 Характеристика симптомів

У другій половині вегетаційного сезону було відібрано декілька кущів картоплі (*Solanum tuberosum* L), які морфологічно відрізнялися від здорових рослин. Основними симптомами були зміни в пагоні, листі, при цьому спостерігалось в'янення та сповільнений ріст.

Під час аналізу відібраних кущів було помічено зміни в листі та бульбах (Рис. 3.1.) . Повного в'янення куща, а також вторинних інфекцій не спостерігалось.

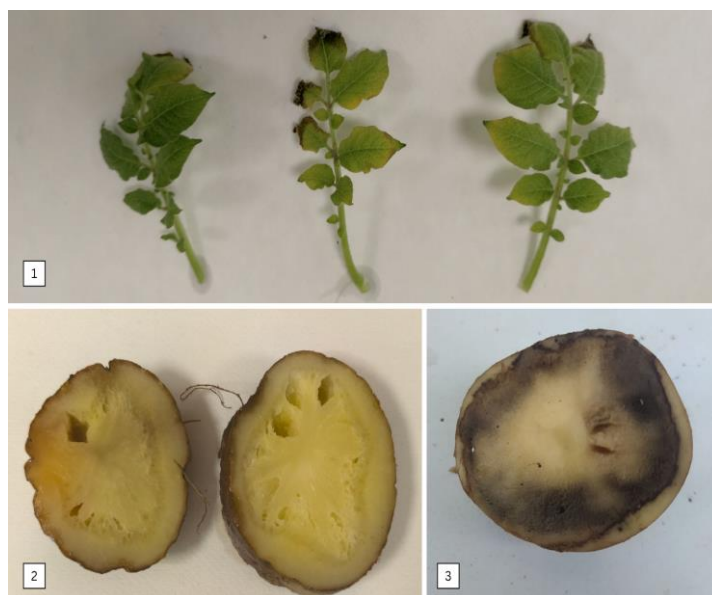


Рис. 3.1 Симптоми зразка картоплі. 1 - листя з хлорозом листка, 2 - бульби з сухими порожнинами, 3 - бульба з мацерацією судинного кільця

Стебло переважно виглядало здоровим, візуально не було помічено ні чорної ніжки, ні повної зміни кольору, ні розм'якшення, ні падіння куща. Окремим ознаками ураження було точкове потемніння до коричневого кольору. Рослина висмикувалась із землі із бульбами, без ламання у зоні кореневої шийки. Натомість пагін мав листове ураження.

Зміни листя варіювали від легкого в'янення до повної втрати тургору, а також в'янення і засихання, із найгіршими проявами в нижніх листках. Близьче до верхівки пагона листя в усіх відібраних кущах мало менш симптомів

незалежно від стану куща. Втрата природної орієнтації листка була характерна для всіх зразків. Найменш уражені листки зберігали тургор та природній колір, хоча на деяких були помітні темні вологі плями. На листках із більшою симптоматикою спостерігався помітний хлороз листкової пластинки із некрозом на верхньому краї листка. На найбільш пошкоджених кущах листки скручувалися в напівколо. Зміни скручених листків залежали від стадії, при цьому менш інфіковані зберігали вологість попри потемніння. На окремих гілках такі листки згорталися масово і могли повністю ховати черешки - такі гілки виглядали повністю огорнутими листками. Найбільш уражені ставали сухими та жорсткими і повністю втрачали зелений колір.

На відміну від листя поверхня бульб виглядала здоровою, без ознак змін у сочевичках. Однак поперечний розріз відібраних бульб дозволив зафіксувати значні зміни в кольорі паренхіми (від кремового до коричнево-чорного), водянистість поверхні розрізу, а також мацеровані та тверді порожнини. Також на деяких бульбах спостерігалось почорніння та розм'якшення в районі судинного кільця. Варто зазначити, що загальна симптоматика проявлялась по всій площі зрізу, що свідчить про глибоке ураження та активну некротрофну фазу, яка тривала деякий час до відбору зразків.

З описаних зразків було виділено та підготовлено чисту культуру бактерій.

За сукупністю симптомів огляд дозволяв припустити хворобу викликану родом *Pectobacteriaceae*

3.2 Характеристика виділеного штаму бактерій

Морфологічні особливості колоній. Морфологію чистих культур ізолятів 2411, 2412 і 2413 досліджували на твердому поживному середовищі в чашках Петрі. Усі три колонії виявляли мали однакові характеристики.

Форма колоній - округла, з рівними краями, подекуди зустрічалися повністю круглі колонії. Окремі колонії зливалися в великі сукупності овальної форми. Розмір колоній варіював від 4 до 5 мм. Поверхня колоній - гладенька, злегка ослизнена та блискуча. Профіль колоній - плаский, злегка випуклий. Колір

варіював від білувато-напівпрозорого до насиченого біло-кремового. Структура колоній однорідна. Консистенція м'яка і довго зберігає м'якість, переважно не висихає навіть на старих зразках, біомаса не тягнеться і майже не прилипає до петлі. Не утворює заглиблень. Переважно не поширює пігмент на середовище. Не утворює міцелій.

На рідкому поживному середовищі - ріст глибинний, не виділяє газ. Вигляд колоній ідентичний для всіх трьох ізолятів зображено на Рис. 3.2



Рис 3.2 Чиста культура ізоляту 2411

Мікроскопічне дослідження клітин. Під час мікроскопічного дослідження встановлено, що усі три ізоляти мають ідентичну морфологію та тинкторіальні властивості. Тинкторіальні властивості вивчали за допомогою фіксованого препарату, а живі за методом роздавленої краплі.

У фіксованих препаратах бактерії мають вигляд прямих коротких паличок із заокругленими кінцями. Усі помічені бактерії мали спільну форму, плеоморфізм не спостерігався. Розміщувались поодинокі, не було помічено сформованих пар, ланцюжоутворення та ознак наявності спор або капсул. На фоні забарвлених клітин не було помічено включень. Ізоляти є грам-негативними. Забарвлення в рожевий колір було рівномірним та інтенсивним.

Прижиттєве дослідження клітин дозволяло зафіксувати активний цілеспрямований рух (обертальний). Попри обмеження світлової мікроскопії можна зробити висновок про наявність джгутиків. Вигляд препарату (однаковий для всіх трьох ізолятів) отриманий через мікроскоп зображено на Рис. 3.3.



Рис 3.3 Зображення отримане через мікроскоп, ізолят 2412

Фітопатологічні характеристики ізолятів. Виділені ізоляти 2411, 2412 і 2413 перевіряли на пектолітичну активність, здатність викликати системну інфекцію та долати локальний імунітет рослин.

Здатність до мацерації картоплі виявили штами 2411 і 2413, а моркви - лише 2411. Досліджувані ізоляти та колекційні штами неоднаково мацерували тканини моркви та картоплі, що підтверджує гетерогенність досліджуваних культур. Серед природних ізолятів найбільш агресивним виявився 2411, а найменш агресивним 2412, при цьому порівняння 2413 і колекційних штамів вказує на функціональну типовість ізоляту, оскільки більшість штамів так само могли мацерувати картоплю і не руйнували моркву. Натомість 2412 виявився нетипово слабким і хоча 2411 був найагресивнішим серед природніх, колекційний штам 8682 виявив подібну ферментативну активність. Отримані результати наведені в Таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 - Мацерація моркви та картоплі

Штам	Мацерація моркви	Мацерація картоплі
9098	-	+
7136	-	+
8982	-	+
8682	+	+
9038	-	+
2411	+	+
2412	-	-
2413	-	+
Контроль	-	-

Ізоляти 2411, 2412, 2413 не спричиняли системну інфекцію куща томату. Місце уколу точково змінювало колір на коричневий, що радше свідчить про механічне ушкодження. Проведений дослід дозволяє припустити, що вивчені ізоляти нездатні викликати системну інфекцію у широкого кола господарів. Висновок про здатність викликати системну інфекцію одного типу господаря - картоплі, базується на тому, що ізолят був виділений з куща, який мав чіткі ознаки м'якої гнилі. Водночас інші штами теж не викликали системну інфекцію, що може свідчити про загальновидову тенденцію. Результати наведені в Таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 - здатність викликати системну інфекцію

Штам	Здатність викликати системну інфекцію
9098	-
7136	-
8982	-
8682	-
9038	-
2411	-
2412	-
2413	-
Контроль	-

У ході дослідження на здатність долати місцевий імунітет усі три ізоляти виявили високу агресивність порівняно з колекційними та іншими дикими ізолятами. Агресивність виявлялася у значній зміні кольору, повному розм'якшенні та характерному насиченому запаху. Порівняння дозволяє припустити загальну виражену здатність долати локальні власні засоби рослинні засоби захисту рослин із патогенами, оскільки ізоляти 2411, 2412, 2413 показали вищі результати як відносно інших диких ізолятів (К.1.1, К.1.2, К.1.3, К.2.3.) так і колекційних штамів, за винятком 8982.

Сукупність фітопатогенних характеристик дозволяє характеризувати досліджені ізоляти як агресивні в обмежених умовах. Ізоляти 2411, 2412 і 2413 виявились найагресивнішими у подоланні локального імунітету, і не відрізнялись від інших культур по ізольованій пектолітичній активності і здатності викликати системну інфекцію. Така тенденція дозволяє припустити, що патоген здатний на більшу шкодочинність в сприятливих умовах (наприклад, успішне подолання локального імунітету та системна інфекція після досягнення критичної концентрації), які, можливо, не вдалося відтворити в ході дослідження. Візуальні результати зображені на Рис. 3.4



Рис 3.4 - Мацерація зелених плодів томату у порядку збільшення розкладу: 1 - початковий стан; 2 - ізолят К.1.2; 3 - штам *Dickeya chrysanthemi* 8683; 4 - ізолят К.1.3; 5 - штам *Dickeya chrysanthemi* 9038; 6 - ізолят К.2.3; 7 - ізолят К.1.1; 8 - штам *Dickeya chrysanthemi* 8683V; 9 - ізолят 2411; 10 - ізолят 2413; 11 - ізолят 2412; 12 - штам *P. carotovorum* 8982.

Дослідження ставлення до кисню. Ізоляти 2411, 2412 і 2413 росли як на середовищі з вазеліном, так і без, що відносить їх до факультативних анаеробів, що відповідає характеристикам *P. carotovorum* (Таблиця 3.3).

Таблиця 3.3 - Дослідження ставлення до кисню

Штам	Ріст на середовищі без вазеліну	Ріст на середовищі з вазеліном	Відношення до кисню
<i>P. carotovorum</i> 8982	+	+	факультативний анаероб
<i>P. syringae</i> 8511	+	-	аероб
2411	+	+	факультативний анаероб
2412	+	+	факультативний анаероб
2413	+	+	факультативний анаероб

Біохімічне дослідження. Отримані біохімічні результати можливо розглядати з точки зору таксономії, а також пояснення екологічних можливостей ізолятів у розрізі фітопатології. Спроможність мацерувати тканини рослини напряму пов'язана з доступними для ізоляту ферментами. Здатність природніх ізолятів мацерувати картоплю та моркву була описана у Розділі 3.2, Таблиці 3.1. У межах порівняння з отриманою фітопатологічною характеристикою варто розглядати потенціал ізолятів 2411, 2412 та 2413 до синтезу окремих ферментів та зв'язок з хімічним складом досліджених рослинних культур. Також варто врахувати, що тест-система дає бінарні результати і не може дати відповідь на активність ферментації, тож усі подальші висновки засновуються на робочому спрощенні про приблизно однакові показники активності ферментів.

Нездатність усіх трьох ізолятів синтезувати бета-галактозидазу та ферментувати арабінозу може пояснити зменшену активність мацерації моркви, яка містить їх в однаковій пропорції та не містить легкодоступного крохмалю, на відміну від картоплі. Згідно з фундаментальними порівнянням описаного в Trabert et al., 2022 [58], для мацерації моркви може знадобитися здатність

розкласти обидві речовини. Попри таке припущення ізолят 2411 виявив значну агресивність мацерації, яка відрізнялась як від інших природних ізолятів, так і зразків з колекції. Згідно з отриманих даних та аналізу джерел можна припустити особливу значущість у здатності ферментувати сахарозу, яка є у 2411 та відсутня у 2412 та 2413. Крім цього варто зазначити, що ізолят 2412 не виявив здатності мацерувати як картоплю, так і моркву. Порівнюючи з біохімічною характеристикою можна припустити, що в цьому може бути задіяний брак здатності утилізувати цитрат і малонат, що відрізняє 2412 від ізолятів, які здатні на мацерацію хоча би одного господаря.

Також варто зазначити, що 2411 є стабільно агресивним штамом, що може пояснюватися тим, що він має здатність до синтезу орнітиндекарбоксилази, аргініндигідролази та ферментації сахарози, здатностей, які не мають інші ізоляти. Ферментація сахарози може значити пряму ферментативну активність, тоді як орнітиндекарбоксилаза та аргініндигідролаза належать до ферментів, що можуть брати участь у комплексній взаємодії рослина-патоген.

Орнітиндекарбоксилювання виконує декілька функцій: обмежує синтез поліамінів, які є частиною проходження реакції на несприятливі умови [59], а також спричиняє утворення кадаверину, котрий збільшується під час оксидативного стресу [60]. Попри те, що кадаверин є фактором захисту рослин, *P. carotovorum* має здатність використовувати захисні механізми від оксидативного стресу у рослин [7]. Зважаючи на те, що кадаверин є ознакою стресу, під час якого, як зазначає Masiag et al., 2024, рослина зменшує захист від патогенів, синтез кадаверину може бути імітацією стресу, яка є стратегією зменшення імунної відповіді рослини. Супутній фермент аргініндигідролаза є частиною утворення орнітину шляхом гідролізу аргініну [61]. Тому наявність ферменту орнітиндекарбоксилази і аргініндигідролази в ізоляту 2411, на відміну від 2412 та 2413, може вказувати на підвищену екологічну адаптивність ізоляту.

Результати біохімічного дослідження наведені в Таблиці 3.4.

Таблиця 3.4 - результати тест системи Entero WELL-Done O

№	Біохімічний тест	Код	2411	2412	2413	8982
1	Орнітиндекарбоксилаза	ODC	1	0	0	0
2	Аргініндигідролаза	ADH	1	0	0	0
3	Утилізація цитрату	CIT	1	0	1	1
4	Утилізація малонату	MLN	0	0	1	1
5	Ферментація сорбіту	SOR	0	1	0	0
6	Ферментація сахарози	SAC	1	0	0	1
7	Бета-галактозидаза	ONPG	0	0	0	1
8	Лізіндекарбоксилаза	LDC	0	0	0	0
9	Фенілаланіндезаміназа	PD	0	0	0	0
10	Уреаза активність	URE	0	0	0	0
11	Продуктування сірководню	H ₂ S	0	0	0	0
12	Реакція Фогеса-Проскауера	VP	1	1	1	1
13	Утворення індолу	IND	0	0	0	0
14	Ферментація глюкози	GLU	1	1	1	1
15	Ферментація маніту	MAN	1	1	1	1
16	Ферментація інозиту	INO	0	0	0	1
17	Ферментація арабінози	ARA	0	0	0	1
18	Ферментація рафінози	RAF	1	1	1	1

Примітка. 1 – позитивна ознака; 0 – негативна ознака.

Згідно коефіцієнтом простої подібності найвищий ступінь біохімічної спорідненості виявлено між парами штамів 2412/2413 (83%) та 2411/2413 (77%). Штам 2412 виявився найбільш віддаленим від 2411 (72%).

Порівняльний аналіз внутрішньої подібності ізолятів (Рис. 3.5а) підтверджує біохімічну відмінність 2411 від інших ізолятів, що збігається з фітопатологічними дослідженнями. Натомість порівняльний аналіз із застосуванням еталонного штаму (Рис.3.5б) підтвердив найбільшу внутрішньовидову типовість 2413 та окремішність 2412, що збігається з фітопатологічними дослідженнями, в яких 2412 був атипово слабким.

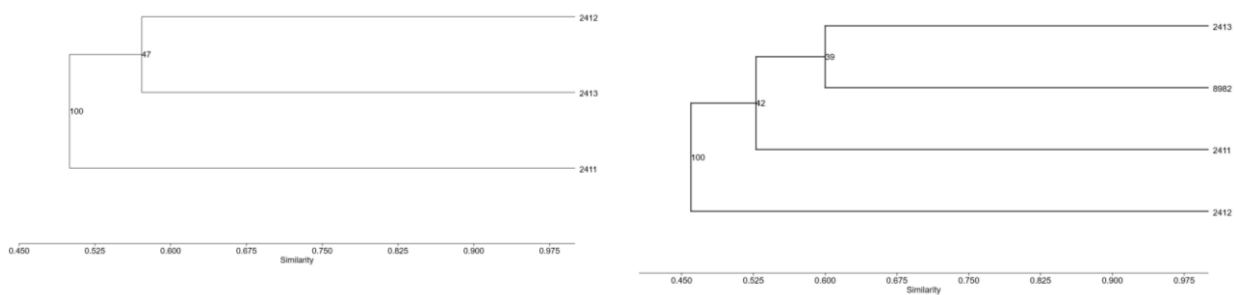


Рис 3.5- Подібність штамів: а – ізоляти; б – ізоляти та еталон

Зведена морфологічна таблиця. Вивчення властивостей ізолятів 2411, 2412 та 2413 дозволяють віднести їх до *P. carotovorum*. (Табл. 3.5.)

Таблиця 3.5 - Порівняльна зведена таблиця ознак

Характеристики	Фітопатогенні бактерії (штами/ізоляти)			<i>Pectobacterium carotovorum</i>
	2411	2412	2413	
Симптоми хвороб	зміна кольору та мацерація			зміна кольору та мацерація
Форма	паличкоподібні			паличкоподібні
Забарвлення за Грамом	негативне			негативне
Рухливість	рухливі			рухливі
Вигляд колоній	Круглі, правильної форми, біло-прозорі. Поверхня гладенька, опукла, злегка слизова.			Круглі, правильної форми, біло-прозорі. Поверхня гладенька, опукла, злегка слизова.
Відношення до кисню	факультативний анаероб			факультативний анаероб
Надчутливість тютюну	не викликає			не викликає
Мацерація картоплі	варіабельно			викликає
Мацерація моркви	варіабельно			викликає
Мацерація зелених плодів томатів	викликає			викликає
Зараження куща картоплі	викликає			викликає

3.3 Чутливість ФПБ до хімічних препаратів

Оцінку чутливості досліджених ізолятів було проведено у розрізі виробничої ефективності та біологічної оцінки. Результати дієвості комерційних препаратів Чемпіон, Світч, Парацельс, Медян, Ефатол наведено в Таблиці 4.1.

Таблиця 4.1 - Ефективність пригнічення росту культури (%)

Штам	Препарат				
	чемпіон	світч	парацельс	медян	ефатол
<i>P. carotovorum</i> 8982	51	-	-	35	-
<i>D. chrysanthemi</i> 8683	23	-	-	-	-
<i>D. chrysanthemi</i> 9038	34	23	-	-	-
<i>P. carotovorum</i> 7136	63*	-	-	63*	-
<i>P. carotovorum</i> 2411	72*	-	-	67*	-
<i>P. carotovorum</i> 2412	73*	-	-	78*	-
<i>P. carotovorum</i> 2413	77	62	65	74	-

* $p < 0.05$

**значення менше 20% сприймалися як неефективні

Згідно з отриманих даних емпіричну ефективність довели препарати Чемпіон та Медян, оскільки вони стабільно викликали відсоток пригнічення росту більше 20%, що для Чемпіона колиалося від 23% до 77%, а для Медяна межі ефективності становили 35-78%. При цьому Чемпіон був ефективний для всіх штамів. У ході дослідження Світч та Парацельс точково показували здатність до пригнічення культур, хоча жоден з результатів по цим препаратам не мав статистичної значущості. Натомість, і Чемпіон, і Медян показали статистичну значущість для трьох культур: *P. carotovorum* 7136, 2411 та 2412. З цього можна зробити висновок про потенційну можливість препаратів впливати на широкий спектр *P. carotovorum*, оскільки згадані штам та ізолят підпадають під умовні три категорії виокремлені під час фітопатологічного дослідження: типовий, агресивний та слабкий. Крім загального інгібування, здатність пригнічувати

широкий спектр внутрішньовидового різноманіття патогену важливо з урахуванням високої гетерогенності виду.

Крім загального аналізу ефективності детальніша характеристика впливу наведена на гістограмі Рис. 4.1.

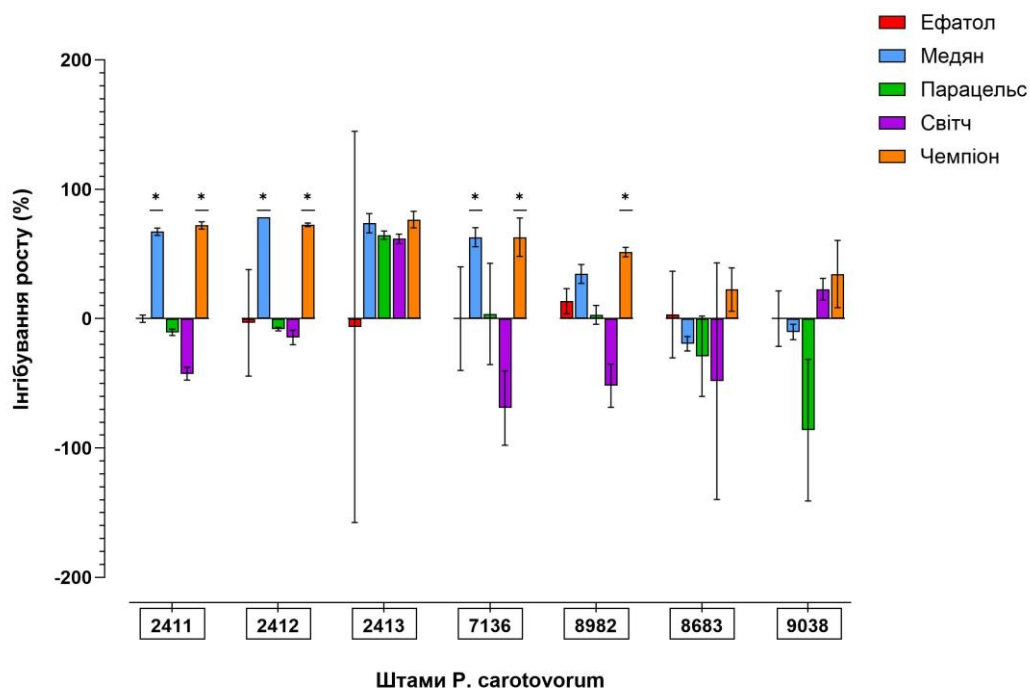


Рис 4.1 - Гістограма: оцінка інгібування росту штамів *P. carotovorum*

Гістограма показує внутрішньовидову гетерогенність представників *P. carotovorum*. Аналіз дозволяє виділити найстійкіші зразки, а саме штами *P. carotovorum* 7136, *P. carotovorum* 8982, *D. chrysanthemi* 8683, а також *D. chrysanthemi* 9038 за рахунок того, що потенційні бактерициди стимулювали ріст бактерій замість його пригнічення. Натомість *P. carotovorum* 2411, 2412 і 2413 майже не зазнавали стимулювання, а також виявляють більшу ступінь інгібування росту. Це може свідчити як про глибокі метаболічні відмінності між групами культур або особливості фенотипової адаптації, на що може натякати відсутність статистичної значущості по більшості зразків в обох групах. Проблематикою дослідження біоконтролю гетерогенних фітопатогенів є сильна відмінність між представниками і висока екологічна адаптація окремих колоній, що створює труднощі у постановці експерименту із достатньою вибіркою, оскільки біологічні особливості можуть бути причиною дуже високої дисперсії.

3.4 Чутливість ФПБ до комерційних біопрепаратів

Аналіз чутливості фітопатогенних бактерій до комерційних препаратів показав різницю в ефективності для кожного окремого штаму та різницю універсальності.

Такі препарати як Фітодоктор старт та Фітохелп мали найбільшу універсальність, після яких був Бітоксисабацилін. Натомість Фітоцид та Фітодоктор лист мали меншу універсальність, однак створили найбільший радіус зони затримки росту для окремих культур (32 мм штаму 8982 та 40 для Фітоциду щодо штаму 8682 відповідно). І Viridin виявив найменшу ефективність, оскільки до його дії чутливим виявився лише штам 7136. Дані наведено в Таблиці 4.2

Таблиця 4.2 - Радіус зон затримки росту після застосування біопрепаратів

Препарат	Радіус зон затримки росту (мм)							
	2411	2412	2413	8982	9038	7136	9098	8682
Фітодоктор старт	22	25	26	24	17	10	-	-
Фітохелп	18	19	17	-	10	6	30	-
Фітодоктор лист	-	-	-	32	14	6	-	-
Бітоксисабацилін	16	19	18	17	12	-	-	-
Фітоцид	17	14	15	18	-	-	-	40
Viridin	-	-	-	-	-	16	-	-

Також наведені результати вказують на різноманітність чутливості окремих штамів та ізолятів щодо біопрепаратів, що ускладнює підбір необхідного засобу біоконтролю без попередньої діагностики.

3.5 Антагонізм *B. amyloliquefaciens* 2410

Аналіз антагонізму штаму *B. amyloliquefaciens* 2410 дозволяє зробити висновок про його високу універсальність внаслідок ефективності щодо усіх штамів і ізолятів представлених у дослідженні. Порівняно з дієвістю біопрепаратів, радіус зон затримки росту є меншим. Пікова дієвість штаму *B. amyloliquefaciens* 2410 сягає 20мм, що вдвічі менше за пікову дієвість Фітоциду в цілому і в 4 рази менше відносно штаму 8682. Водночас штам виявляє

стабільний помірний антагоніст і зона затримки росту присутня щонайменше на 2-5мм, що не спостерігається для біопрепаратів, які могли співіснувати з колоніями фітопатогенних бактерій. Дані наведено в Таблиці 4.3

Таблиця 4.3 - Радіус зон затримки росту після застосування *B. amyloliquefaciens*

Культура	Зона затримки росту (мм)
<i>Pseudomonas syringae</i> 8511	15-17
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 8573	12-20
<i>Pectobacterium carotovorum</i> 8982	7-10
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 8628	2-5
<i>Dickeya chrysanthemi</i> 9038	15
<i>Xanthomonas</i> sp. 9098	15
<i>Dickeya chrysanthemi</i> 8683	15
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> 8682	10-12

3.6 Вплив *B. amyloliquefaciens* 2410 на рослини

Показники схожості насіння залишались високими (81,2% для розведення 1:50; 87,8% для розведення 1:100; 84% для контролю), що свідчить про відсутність фітотоксичного ефекту на ранніх етапах онтогенезу. Також спостерігається тенденція кращого росту для розведення стократного розведення та зменшення приросту біомаси для п'ятидесятикратного порівняно з контролем. Отримані дані (Рис. 4.2) можуть свідчити про позитивний ефект застосування суспензії антагоністичних мікроорганізмів у малих концентраціях

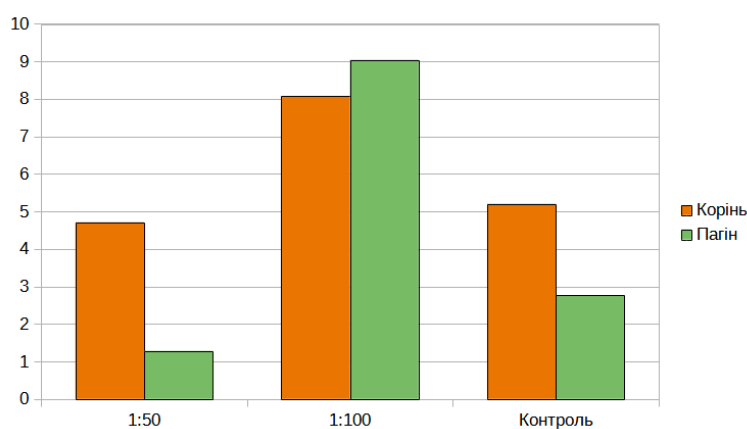


Рис. 4.2 – Довжина пагонів і коренів (см) пшениці при застосуванні штаму *B. amyloliquefaciens* 2410

ВИСНОВКИ

Відповідно до поставленої мети було вирішено низку завдань:

1. Зі зразків ураженої картоплі виділено і підтримано у чистій культурі збудників інфекції - *Pectobacterium carotovorum* 2411, 2412, 2413
2. За сукупністю ознак патоген ідентифіковано як *Pectobacterium carotovorum*, а саме за результатами аналізу біохімічних ознак, мікроскопії і пектолітичної активності порівняно з типовими штамми. Також проаналізовано властивості самих штамів, які підпадають під категорію сильного, слабого та типового за рівнем вірулентності.
3. Проведено заходи біоконтролю із застосуванням хімічних препаратів та бактерій-антагоністів і виявлено, що ефективність значно залежить від індивідуальних особливостей ізоляту, що підтверджує початкову тезу про внутрішньовидову гетерогенність. Серед хімічних препаратів найвищу ефективність виявили препарати міді з прямою бактерицидною дією. Комерційні препарати виявили вищу агресивність, але меншу універсальність, тоді як з штамом-антагоністом *Bacillus amyloliquefaciens* 2410 виявлено протилежну тенденцію.
4. Межі ефективності досліджених засобів біоконтролю визначено за критеріями дієвості та універсальності, які стикаються з потребою діагностики через фенотипове різноманіття патогену. Застосування антагоністичних мікроорганізмів, зокрема *Bacillus amyloliquefaciens* 2410, може забезпечити вищу універсальність попри нижчу дієвість. Підхід використання антагоністичних мікроорганізмів визначено оптимальним з урахуванням життєвої стратегії патогена.
5. У результаті дослідження виявлено штам *Bacillus amyloliquefaciens* 2410, який може бути використаний для виробництва біотехнологічних препаратів для рослинництва.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. *Plant diseases caused by Dickeya and Pectobacterium species* / ed. by F. Van Gijsegem, J. M. van der Wolf, I. K. Toth. Cham : Springer Nature, 2021. 308 p.
2. Genetically engineered bacterial strains constructed as a whole-cell biosensor for specific volatiles identification of infected potato tubers with a soft rot disease / B. Veltman et al. // *Sensors Actuators B Chem.* 2023. Vol. 387. Art. 133788.
3. *Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria* / P. R. Davidsson et al. // *Frontiers in Plant Science.* 2013. Vol. 4. Art. 191.
4. Biological control of the soft rot bacterium *Pectobacterium carotovorum* by *Bacillus amyloliquefaciens* strain Ar10 producing glycolipid-like compounds / S. Azaiez et al. // *Microbiol. Res.* 2018. Vol. 217. P. 23–33.
5. Посівні сільгоспкультур під урожай 2023 по регіонах. Держстат України. 2024. URL: https://ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2022/sg/pvzu/arch_pvXu_reg.htm
6. Рослинництво (1991–2024) : стат. інформація / Держстат України. Київ, 2024. URL: <https://zt.ukrstat.gov.ua/StatInfo/Sil/sgroslin.htm>
7. Looking for Resistance to Soft Rot Disease of Potatoes Facing Environmental Hypoxia / T. Maciag et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. Vol. 25, no. 7. Art. 3757.
8. Taxonomic relatedness between *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* subsp. nov / S. Nabhan et al. // *J. Appl. Microbiol.* 2012. Vol. 113, Iss. 4. P. 904–913.
9. Genome Wide Analysis of the Potato Soft Rot Pathogen *Pectobacterium carotovorum* Strain ICMP 5702 to Predict Novel Insights into Its Genetic Features / T. Mallick et al. // *Plant Pathol. J.* 2022. Vol. 38, no. 2. P. 102–114.
10. Genome Wide Analysis of the Potato Soft Rot Pathogen *Pectobacterium carotovorum* Strain ICMP 5702 to Predict Novel Insights into Its Genetic Features / T.

Mallick, R. Mishra, S. Mohanty, R. K. Joshi. The Plant Pathology Journal. 2022. Vol. 38, no. 2. P. 102–114. DOI: <https://doi.org/10.5423/ppj.oa.12.2021.0190>

11. Логоша Р. В., Козловська Л. М. Маркетингова стратегія просування біопрепаратів в Internet-торгівлі. Наук. інновації та передові технології. Серія: Економіка. 2023. № 10(24). С. 441–453.

12. Martín-Cardoso H., San Segundo B. Impact of Nutrient Stress on Plant Disease Resistance // Int. J. Mol. Sci. 2025. Vol. 26, no. 4. Art. 1780

13. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин : монографія / Р. І. Гвоздяк та ін. ; за ред. В. П. Патики. Київ : НВП «Інтерсервіс», 2011. 444 с.

14. Pastor V., Cervero R., Gamir J. The simultaneous perception of self- and non-self-danger signals potentiates plant innate immunity responses // Planta. 2022. Vol. 256. Art. 10.

15. Герасимчук І. В. Порівняння способів оцінки сортів картоплі на стійкість до мокрої бактеріальної гнилі // Ефективність агротехнологій в зоні Полісся України : матеріали III-ї Всеукр. наук.-практ. конф. (м. Житомир, 23–24 листоп. 2023 р.). Житомир, 2023. С. 71.

16. Molecular interactions between crops and phytopathogens volume III: Vegetables and other crops / M. Zhang [et al.] // Front. Plant Sci. 2022. Vol. 13. Art. 979342.

17. Colonization patterns of an mCherry-tagged *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain in potato plants / G. C. Kubheka [et al.] // Phytopathology. 2013. Vol. 103, № 12. P. 1268–1279.

18. Загальна фітопатологія : навч. посіб. / Н. В. Пінчук, П. М. Вергелес, Т. М. Коваленко, С. Є. Окрушко ; за ред. Н. В. Пінчук. Вінниця : ВНАУ, 2019. 276 с.

19. Schumann G. L., D'Arcy C. J. Essential Plant Pathology. 2nd ed., 11th printing. St. Paul, 2021. 384 p.

20. Antagonistic activity of endophytic actinobacteria from native potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* L.) against *Pectobacterium carotovorum* subsp.

carotovorum and *Pectobacterium atrosepticum* / N. Padilla-Galvez [et al.] // BMC Microbiology. 2021. Vol. 21. Art. 335.

21. Perombelon M. C. M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis // Plant Pathology. 2002. Vol. 51, № 1. P. 1–12
Potato tuber origin and microbial composition determines resistance against soft rot *Pectobacteriaceae* / V. Kurm, O. Mendes, J. Gros, J. van der Wolf // European Journal of Plant Pathology. – 2024. – Vol. 168. – P. 383–399. – DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-023-02763-3>.

22. Інтегрований захист картоплі від хвороб, шкідників і бур'янів : навч. посіб. / В. М. Положенець [та ін.]. Житомир, 2024. 428 с.

23. The Bacterial Soft Rot Pathogens, *Pectobacterium carotovorum* and *P. atrosepticum*, Respond to Different Classes of Virulence-Inducing Host Chemical Signals / P. A. Agyemang [et al.] // Horticulturae. 2020. Vol. 6, Iss. 1. Art. 13..

24. Гвоздяк Р. І., Гойчук А. Ф., Розенфельд В. В. Лісова фітопатобактеріологія : навч. посіб. / за ред. А. Ф. Гойчука. Київ : ВД «Вініченко», 2014. 252 с

25. Phylogenetic position of phytopathogenic Enterobacteriaceae / L. Hauben [et al.] // Syst. Appl. Microbiol. 1998. Vol. 21, № 3. P. 384–397.

26. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way / H. Vlamakis [et al.] // Nat. Rev. Microbiol. 2013. Vol. 11, № 3. P. 157–168.

27. Emergence of active nematics in chaining bacterial biofilms / Y. I. Yaman, E. Demir, R. Vetter, A. Kocabas // Nature Communications. – 2019. – Vol. 10. – Art. 2285. – DOI: 10.1038/s41467-019-10311-z.

28. Biofilm formation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* on polypropylene surface during multiple cycles of vacuum cooling / H. Pu [et al.] // Int. J. Food Sci. Technol. 2021. Vol. 56, № 7. P. 3495–3506.

29. Distribution of *Pectobacterium* species isolated in South Korea and comparison of temperature effects on pathogenicity / S. Jee [et al.] // Plant Pathol. J. 2020. Vol. 36, № 4. P. 346–354..

30. Carvacrol and Streptomycin in Combination Weaken Streptomycin Resistance in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* / Y. Shen [et al.] // *Plants*. 2025. Vol. 14, № 6. Art. 908..
31. Bacterial Urease and its Role in Long-Lasting Human Diseases / I. Konieczna [et al.] // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2012. Vol. 13, no. 8. P. 789–806.
32. Стоянова К. Є. Епідеміологія карантинних хвороб картоплі в Україні та Європі // *Фітосанітарна безпека*. 2024. Вип. 70. С. 331–346.
33. Climate Change Impacts for Ukraine / L. Wilson [et al.]. Met Office, 2021. 30 p. URL: https://mepr.gov.ua/wp-content/uploads/2023/07/2_Vplyv-zminy-klimatu-v-Ukrayini.pdf
34. Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward / B. Singh [et al.] // *Nat. Rev. Microbiol.* 2023. Vol. 21. P. 640–654.
35. Impact of Climate Change on Plant Diseases / S. Juroszek [et al.]. *Plant Pathology*. 2020. Vol. 69, no. 9. P. 1580–1592. DOI: 10.1111/ppa.13250
36. The microbiome of cereal plants / K. Michl [et al.] // *Environ. Microbiome*. 2023. Vol. 18, № 1. Art. 28.
37. Волкогон В. В. Ефективність симбіозу бульбочкових бактерій з рослинами сої / В. В. Волкогон, М. С. Комок // *Бюлетень Інституту зернового господарства*. – 2010. – № 39. – С. 89–93. – Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/bisg_2010_39_26
38. Сінченко В. М., Фурман П. В. Симбіотична продуктивність та урожайність квасолі звичайної залежно від технологічних прийомів вирощування // *Корми і кормовиробництво*. 2023. Вип. 96. С. 63–71.
39. Фітопатогенні бактерії, методи досліджень : монографія : у 2 т. / В. П. Патики та ін. ; за ред. В. П. Патики. Вінниця : ТОВ Віндрук, 2017. Т. 2. 432 с
40. The Growth-promoting and Antipathogenic Effects of Microorganisms Isolated from *Solanum nigrum* L. and Inoculated in *Solanum lycopersicum* L. / V. Borodai [et al.] // *Open Agric. J.* 2022. Vol. 16. Art. e187433152208180.

41. *Bacillus amyloliquefaciens: Harnessing Its Potential for Industrial, Medical, and Agricultural Applications-A Comprehensive Review* / I. Zalila-Kolsi [et al.] // *Microorganisms*. 2023. Vol. 11, № 9. Art. 2215.
42. Morphogenesis and mechanical properties of *Bacillus amyloliquefaciens* biofilms: a comparative study of rough and smooth morphotypes / E. Baudu [et al.] // *Curr. Res. Microb. Sci*. 2025. Vol. 8. Art. 100403.
43. Isolation and Characterization of a *Bacillus amyloliquefaciens* Bacteriophage JBA6 and Its Endolysin PlyJBA6 / J. Kim, M. Kong // *J. Microbiol. Biotechnol*. 2025. Vol. 35. Art. e2502026
44. Afrin S., Bhuiyan M. N. I. Antagonistic activity of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* against multidrug resistant *Serratia rubidaea* // *Curr. Res. Microb. Sci*. 2023. Vol. 5. Art. 100206.
45. Isolation and Identification of Antagonistic Bacteria with Common Bacterial Blight of Common Bean and Their Mechanism as Biological Control / M. Liu [et al.] // *Agronomy*. 2025. Vol. 15, no. 9. Art. 2176.
46. Фунгіцид Чемпіон, ЗП. Nufarm. URL: https://nufarm.com/ua/product/%D1%87%D0%B5%D0%BC%D0%BF%D1%96%D0%BE%D0%BD_%D0%B7%D0%BF/
47. Світч для дач та городів : веб-сайт. URL: <https://www.syngenta.ua/svitch-dlya-dach-ta-gorodiv>
48. Фунгіцид Парацельс. URL: <https://s-sad.com.ua/sredstva-zashhity/fungiitsid-paratsel>
49. Фунгіцид Медян Екстра 350 SC. URL: <https://summit-agro.com.ua/product/organik-standart/medyan-ekstra-350-sc-ks>
50. Фунгіцид Ефатол, з.п. URL: <https://himagro.com.ua/product/zasobi-zaxistu-roslin/efatol>
51. Реєстр пестицидів та агрохімікатів / Мінекономіки України. URL: <https://me.gov.ua/view/81ff784f-bf40-41ed-9b5f-cfd3178b1966>
52. Фітохелп : веб-сайт / БТУ-ЦЕНТР. URL: <https://btu-center.com/fitoxelp>

53. Біопрепарат ФітоДоктор Старт / ЕНЗИМ-АГРО. URL: <https://agro.enzim.biz/fitodoktor-start.html>
54. Біопрепарат ФітоДоктор Лист / ЕНЗИМ-АГРО. URL: <https://agro.enzim.biz/fitodoktor-list.html>
55. Біопрепарат Фітоцид-р / БТУ-ЦЕНТР. URL: <https://btu-center.com/fitocid>
56. Біопрепарат Бітоксібацилін-БТУ / БТУ-ЦЕНТР. URL: <https://btu-center.com/bitoksibacilin-btu>
57. Біопрепарат Віридин (Трихомердин) / ЕНЗИМ-АГРО. URL: <https://agro.enzim.biz/viridin-trihodermin.html>
58. Chemical composition and technofunctional properties of carrot (*Daucus carota* L.) pomace and potato (*Solanum tuberosum* L.) pulp as affected by thermomechanical treatment / A. Trabert [et al.] // Eur. Food Res. Technol. 2022. Vol. 248. P. 2451–2470.
59. Decarboxylases from Solanaceae Plants Producing Tropane Alkaloids / L. Zeng [et al.] // Horticulturae. 2025. Vol. 11, no. 7. Art. 748.
60. Jancewicz A. L., Gibbs N. M., Masson P. H. Cadaverine's Functional Role in Plant Development and Environmental Response // Front. Plant Sci. 2016. Vol. 7. Art. 870.
61. L-lysine decarboxylase : database entry / UniProt Consortium. URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P74535/entry>