

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття
_____ **Олена КВАСКО**

«_____» _____ 2025 р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Біопротекторні властивості мікроорганізмів роду *Bacillus* виділених з ґрунту органічного землеробства»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Гарант освітньої програми

Кандидат біологічних наук,
доцент кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

_____ **Олена КВАСКО**
(підпис)

Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи

Кандидат біологічних наук,
доцент кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

_____ **Олена КВАСКО**
(підпис)

Виконала

_____ **Софія КОРНІЛЕВСЬКА**
(підпис)

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології
Кафедра екобіотехнології та біорізноманіття
Освітній ступінь «Бакалавр»
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

екобіотехнології та біорізноманіття

_____ **Олена КВАСКО**

«_____» _____ 2025 р.

З А В Д А Н Н Я НА ВИПУСКНУ БАКАЛАВРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНКИ

_____ Корнілевської Софії Ігорівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біопротекторні властивості мікроорганізмів роду *Bacillus* виділених з ґрунту органічного землеробства

керівник роботи к.б.н., доцент Кваско О.Ю.

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом НУБіП України від «22» жовтня 2024 р. № 1880 «С» _____

2. Строк подання студентом роботи 19 травня 2025

3. Вихідні дані до роботи орієнтовний перелік літератури; список методів визначення антагоністичної активності *Bacillus spp.*; приблизний перелік біохімічних тестів для підтвердження родової належності *Bacillus spp.*

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Виділення ізолятів *Bacillus spp.* з орного ґрунту; визначення антагоністичної активності ізолятів *Bacillus spp.*; проведення біохімічних тестів для підтвердження родової належності *Bacillus spp.*.

5. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1	к.б.н., доцент Кваско О.Ю.	18.09.2024	18.09.2024
2	к.б.н., доцент Кваско О.Ю.	11.12.2024	11.12.2024
3	к.б.н., доцент Кваско О.Ю.	22.02.2025	22.02.2025

6. Дата видачі завдання 1 вересня 2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів випускної бакалаврської роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Розділ 1. Огляд літературних джерел відповідно до теми	Вересень- листопад	
2.	Розділ 2. Матеріали та методи дослідження	Грудень- січень	
3	Розділ 3. Результати дослідження	Лютий- квітень	
4.	Висновки та оформлення списку літератури	Травень	

Студентка _____ **Софія КОРНІЛЕВСЬКА**
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____ **Олена КВАСКО**
(підпис) (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Робота виконана на 60 сторінках та складається зі вступу, трьох розділів, висновків. Окрім цього, вона вміщує 9 рисунків, 9 таблиць, перелік умовних позначень, список використаних джерел та додатки.

Мета: виділити з ґрунту органічного землеробства ізоляти мікроорганізмів роду *Bacillus*, які проявляють біопротекторні властивості відносно фітопатогенних мікроміцетів.

Завдання:

- Обґрунтувати потенціал бактерій роду *Bacillus*, як перспективних мікроорганізмів із біопротекторними властивостями.
- Виділити мікроорганізми з ґрунту органічного землеробства та відібрати по морфолого-культуральним ознакам ізоляти що належать до роду *Bacillus*.
- Визначити здатність відібраних ізолятів пригнічувати розвиток фітопатогенних мікроміцетів та виокремити найбільш перспективні ізоляти.
- Провести детальну фенотипову ідентифікацію відібраних ізолятів для первинної ідентифікації *Bacillus*.

Об'єкт дослідження: мікроорганізми роду *Bacillus*.

Предмет дослідження: антагоністичні властивості бактерій *Bacillus spp.*

Результати дослідження:

- Проведено літературний огляд на основі якого обґрунтовано біопротекторний потенціал бактерій роду *Bacillus*. Досліджено препарати до складу яких входять мікроорганізми даного роду, механізм пригнічення фітопатогенів.
- Виділено мікроорганізми з ґрунту, розглянуто їх культуральні ознаки та морфологічні риси. Відібрано 5 ізолятів, що при первинній ідентифікації були подібні до бактерій роду *Bacillus*, тобто за формою колонії переважно

були округлими, а їх краї – нерівними. Вони мали гладку поверхню, білий та кремовий колір, непрозорі, опуклі.

- Використано метод агарових блоків для оцінки здатності п'яти ізолятів пригнічувати мікроміцети. Виявлено, що ізоляти під номером 1, 2 та 3 не були активними. В свою чергу, через 7 діб від початку дослідження встановлено, що коефіцієнт активності ізолята номер 4 складав 2,67 (діаметр зони затримки росту 16 мм), а показник активності ізолята номер 5 становив 3,33 (діаметр зони інгібування 20 мм).
- Виокремлено 2 найбільш активних ізолята і застосовано метод зустрічних культур з метою оцінки фунгіцидної дії відносно *Fusarium culmorum*. В першій чашці Петрі фіксувалось стримування росту мікроміцета навіть через 30 днів спільного культивування з бактеріальним агентом, тоді як в другій чашці Петрі бактерії обмежували ріст гриба лише на початкових етапах. До того ж, пригнічення розвитку *Fusarium culmorum* супроводжувалось морфологічними змінами його колонії.
- З метою подальшої ідентифікації виконано фарбування за Грамом, з'ясовано, що бактерії є грампозитивними (колір після фарбування лишився темно-фіолетовим), встановлено, що ізоляти мають здатність розщеплювати казеїн, крохмаль, характеризуються каталазною активністю, що є типовим для представників роду *Bacillus*.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	9
ВСТУП.....	10
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	11
1.1. Біологічні особливості бактерій роду <i>Bacillus</i>	11
1.2. Поширення <i>Bacillus spp.</i> в орних ґрунтах.....	15
1.3. Синтез біологічно активних речовин <i>Bacillus spp.</i>	18
1.3.1. <i>Продуктування антибіотиків бактеріями роду Bacillus</i>	18
1.3.2. <i>Синтез ферментів Bacillus spp.</i>	21
1.3.3. <i>Мікроорганізми роду Bacillus в ролі продуцентів сидерофорів</i>	23
1.4. Стимулювання росту рослин бактеріями <i>Bacillus spp.</i>	25
1.4.1. <i>Доступність поживних речовин</i>	25
1.4.2. <i>Виробіток фітогормонів</i>	26
1.5. Препарати-біопротектори на основі бактерій роду <i>Bacillus</i>	28
1.6. Проблеми та перспективи препаратів на основі <i>Bacillus spp.</i>	30
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	33
2.1. Виділення ізолятів мікроорганізмів із ґрунтів органічного виробництва.....	33
2.1.1. <i>Приготування ґрунтової суспензії та посів мікроорганізмів</i>	33
2.1.2. <i>Вирощування на поживних середовищах</i>	35
2.2. Визначення антагоністичної активності мікроорганізмів	37
2.2.1. <i>Метод зустрічних культур</i>	37
2.2.2. <i>Метод агарових блоків</i>	38
2.3. Ідентифікація бактерій роду <i>Bacillus</i>	39
2.3.1. <i>Фарбування за Грамом</i>	40
2.3.2. <i>Біохімічні тести</i>	42
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	43
3.1. Підбір поживних середовищ для вирощування мікроорганізмів	43
3.2. Морфолого-культуральні ознаки бактеріальних колоній	44

3.3. Встановлення антагоністичної активності на основі методу агарових блоків.....	46
3.4. Визначення антагоністичної активності на основі методу подвійних (зустрічних) культур	48
3.5. Результати фарбування за Грамом та біохімічних тестів.....	50
ВИСНОВКИ.....	53
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	54
ДОДАТКИ.....	61

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АБК – абсцизова кислота

АЦК-дезаміназа – 1-аміноциклопропан-1-карбоксилат дезаміназа

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ДНКаза – дезоксирибонуклеаза

ІОК – індоліл-3-оцтова кислота

МПА – м'ясо-пептонний агар

РНК – рибонуклеїнова кислота

УФ – ультрафіолетове випромінювання

ВСТУП

Мікроорганізми роду *Bacillus* – грампозитивні паличкоподібні бактеріальні агенти, що є продуцентами широкого спектру вторинних метаболітів. Основні групи сполук – антибіотики, ферменти, сидерофори та фітогормони забезпечують захист культур від фітопатогенних організмів, стимулюють ріст, активізують стійкість рослин до стресових факторів.

Актуальність теми обумовлена тенденцією до відмови від застосування традиційних пестицидів, оскільки вони забруднюють навколишнє середовище, знижують якість сільськогосподарської продукції, негативно впливають на здоров'я людини внаслідок споживання товарів, що забруднені хімічними засобами захисту рослин. Бактерії роду *Bacillus* доцільно використовувати в якості біопротекторів фунгіцидної, бактеріостатичної та бактерицидної дії як аналог отрутохімікатам.

Мета: виділити з ґрунту органічного землеробства ізоляти мікроорганізмів роду *Bacillus*, які проявляють біопротекторні властивості відносно фітопатогенних мікроміцетів.

Завдання:

- Обґрунтувати потенціал бактерій роду *Bacillus*, як перспективних мікроорганізмів із біопротекторними властивостями.
- Виділити мікроорганізми з ґрунту органічного землеробства та відібрати по морфолого-культуральним ознакам ізоляти що належать до роду *Bacillus*.
- Визначити здатність відібраних ізолятів пригнічувати розвиток фітопатогенних мікроміцетів та виокремити найбільш перспективні ізоляти.
- Провести детальну фенотипову ідентифікацію відібраних ізолятів для первинної ідентифікації *Bacillus*.

Об'єкт дослідження: мікроорганізми роду *Bacillus*.

Предмет дослідження: антагоністичні властивості бактерій *Bacillus spp.*

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біологічні особливості бактерій роду *Bacillus*

Bacillus – рід грампозитивних бактерій, що характеризуються паличкоподібною формою. Зазвичай представники роду є аеробними, проте іноді виявляються й анаеробні мікроорганізми. Їх основне місце поширення – це ґрунтове середовище та водойми. Варто зазначити, що часто термін «*bacillus*» застосовують відносно більшості паличкоподібних бактерій, чи тих, які мають циліндричну форму. Найбільший за розміром вид *Bacillus* – *Bacillus megaterium* має розмір 1,5×4 мкм. Окрім цього, мікроорганізми роду часто можна зустріти у вигляді ланцюгів [1]. Систематичне положення зазначено в табл. 1.1.

Таблиця 1.1

Систематичне положення *Bacillus spp.* [2].

Домен	<i>Bacteria</i>
Відділ	<i>Firmicutes</i>
Клас	<i>Bacilli</i>
Порядок	<i>Bacillales</i>
Родина	<i>Bacillaceae</i>
Рід	<i>Bacillus</i>

Німецький науковець Фердинанд Кон у 1877 році здійснив дослідження *Bacillus subtilis* в ході якого було виявлено, що один аналізований штамп гинув під дією високих температур, а інший виявляв стійкість до несприятливих умов. Саме другу форму вчений назвав «спорами» (ендоспори) та відзначив, що дані структури здатні знаходитись як у вегетативному, так і в активному стані. Особливість ендоспор полягає не лише у стійкості до надвисоких температур, а й у збереженні життєздатності під впливом агресивних хімічних речовин, УФ-

випромінювання та навіть радіації. Ендоспори можуть переноситись з ґрунту до часточок пилу [1].

Споруляція під час якої утворюються ендоспори відбувається лише в аеробних умовах. При окисненні запасних ліпідів, а саме полі- β -гідроксимасляної кислоти, клітина отримує енергію, яка потрібна для активного спороутворення.

Відповідно до морфології спор та дії на цитоплазму, в якій вони утворюються, рід *Bacillus* поділяють на 3 групи:

- 1 група – бактерії, що містять невелику кількість поживних речовин. Спори еліпсоїдні та не провокують збільшення цитоплазми в об'ємі. Перша підгрупа включає такі мікроорганізми як *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* та *Bacillus anthracis*. Їх клітини характеризуються розміром, що перевищує 1 мкм. Друга підгрупа охоплює бактерії, для клітин яких притаманним є ширина менше 1 мкм (*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*).
- 2 група – це бактерії, які також утворюють спори еліпсоїдної форми, проте на відміну від 1 групи вони спричиняють розтягнення цитоплазми (*Bacillus circulans*, *Bacillus macerans*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus alvei*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus larvae*, *Bacillus lentimorbus*).
- 3 група – бактерії, спори яких мають сферичну форму (*Bacillus sphaericus*) [3].

Клітинні стінки переважної більшості бактерій містять пептидоглікан – гетерополімер, в якому ланцюги з'єднані короткими пептидами. N-ацетилглюкозамін та N-ацетилмурамова кислота – основні компоненти ланцюгів, що являють собою ефіри N-ацетилглюкозаміна та молочної кислоти відповідно. Пептидний ланцюг має здатність приєднуватись до -COOH групи молочної кислоти. Пептидні ланцюги, які знаходяться близько один до одного, іноді з'єднуються горизонтальними зшивками. Іншим способом з'єднання

ланцюгів виступають міжпептидні містки. В пептидних ланцюгах зазвичай між собою чергуються L- та D-амінокислоти.

Грамнегативні бактерії не вирізняються особливою різноманітністю структури та хімічного складу пептидоглікана, через що при їх ідентифікації аналіз даного компонента бактеріальної клітини не є першочерговим. Грампозитивні бактерії, на відміну від грамнегативних, мають багато варіацій структури пептидоглікана та співвідношення хімічних елементів, що входять до його складу. Загалом існує близько 100 відомих видів пептидогліканів. Склад клітинної стінки грампозитивних бактерій є однією з ключових ознак при ідентифікації не лише внаслідок раніше описаного розмаїття типів, але й через відсутність істотних змін структури та хімічного складу пептидогліканів при різних умовах культивування. Для видів *Bacillus* стандартним є з'єднання муреїну з пептидами через мезодіамінопімелінову кислоту [4]. Морфологічні ознаки наведено на рис. 1.1. Біохімічні та фізіологічні характеристики бактерій роду *Bacillus* зазначено в табл. 1.2.



Рис. 1.1. Морфологія *Bacillus spp.* візуалізована з допомогою фарбування за Грамом (збільшення 10-кратне) [5].

Фізіологічні та біохімічні характеристики *Bacillus spp.* [6,7].

Тест	Результат
Каталаза	Позитивний
Оксидаза	Негативний
Продуктування індолу	Негативний
Ріст в 6,5% NaCl	Позитивний
Використання цитрату	Здебільшого позитивний
Тест Фогеса-Проскауера	Негативний
Тест із застосуванням метилового червоного	Позитивний/негативний залежно від виду
Продуктування H ₂ S	Позитивний/негативний залежно від виду
Уреазна активність	Негативний
Гідроліз желатину	Позитивний
Гідроліз казеїну	Позитивний
Гідроліз крохмалю	Позитивний
Гідроліз жирів	Негативний
Перетворення глюкози на кислоти	Позитивний
Утворення газу з глюкози	Негативний
Перетворення маніту на кислоти	Позитивний/негативний залежно від виду
Перетворення арабінози на кислоти	Позитивний/негативний залежно від виду
Зниження рівня нітратів	Здебільшого позитивний
ДНКза	Здебільшого позитивний
Ферментація фруктози	Позитивний/негативний залежно від виду
Ферментація декстрази	Позитивний/негативний залежно від виду

Стандартний розмір колоній *Bacillus* на щільних середовищах становить 2-6 мм. Їх форма може бути як округлою, так і неправильною. Краї колоній або рівні або хвилясті. При культивуванні колонії блищать, їх поверхня відносно гладка. Зазвичай ізоляти *Bacillus subtilis* мають біле забарвлення, рідше – кремове. В свою чергу, колонії *Bacillus cereus* відзначаються сірим кольором на спеціально підібраних селективних поживних середовищах [8].

Єдиних оптимальних температур і рН для розвитку *Bacillus spp.* не існує. Для *Bacillus subtilis* найсприятливішими є температура 37-42 °С та слабколужне середовище, а точніше діапазон 6,8-7,6. *Bacillus megaterium* активно росте при 32 °С, а при температурах, що перевищують 45 °С, чи становлять менше, ніж позначка у 15 °С, ріст сповільнюється. Необхідно зазначити, що для цього виду найкраще підходить нейтральний рН. *Bacillus stearothermophilus* є термофільною бактерією, що росте при температурних значеннях вище 65 °С. *Bacillus coagulans* – анаеробний представник роду, який розвивається у слабкокислому середовищі (рН=5,5-6,5) при 35-50 °С [9,10]. Зображення колоній наведено на рис. 1.2.

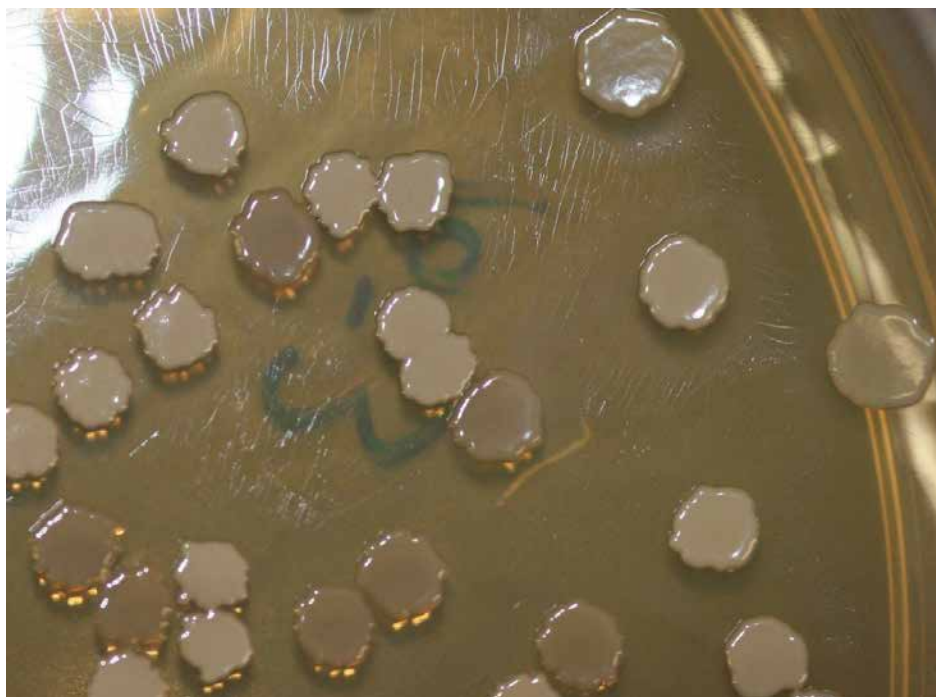


Рис. 1.2. Колонії *Bacillus spp.* на поживному середовищі [11].

1.2. Поширення *Bacillus spp.* в орних ґрунтах

Раніше згадувалось, що бактерії роду *Bacillus* поширені в ґрунтовому середовищі та водних джерелах, а ендоспори здатні переноситись повітряним шляхом разом з часточками пилу. Розповсюдження даних мікроорганізмів у ґрунті має позитивний ефект завдяки їх придатності до ураження фітопатогенів, продукції важливих сполук, які інтенсифікують ріст рослин.

Аналізуючи розмаїття мікроорганізмів в орних ґрунтах варто зазначити, що частка відділу *Firmicutes* від загального консорціуму становить 2-20%. Причиною подібної варіативності виступають агротехнічні прийоми, а точніше – тип добрив та система сівозміни. Більший відсоток ізолятів фіксується в ґрунті, для якого обрано сівозміну, а не безперервну обробку. Ймовірніше за все це пов'язано з великою кількістю корневих структур, рослинних залишків у ґрунтах із сівозміною [12].

В одному з експериментів науковці ідентифікували велику кількість представників *Firmicutes* в піщано-глинистому ґрунті для якого було застосовано сівозміну. Культури, що послідовно вирощувались – помідори та картопля, чи цибуля. Спираючись на те, що ізоляти *Bacillus spp.* є частиною відділу *Firmicutes*, для них притаманні подібні закономірності. Частка бактеріальних агентів роду *Bacillus* в середньому складала 10% [13].

Існують винятки, які ілюструють більше поширення родів відділу *Firmicutes* в монокультурних орних ґрунтах, ніж у землях із сівозміною, чи кращий розвиток названих мікроорганізмів при довготривалому вирощуванні однієї та тієї ж групи рослини, ніж при використанні короткої монокультури. Згідно з дослідженнями американських вчених, найвищу кількість та різноманітність бактерій відділу *Firmicutes* виявлено у ґрунті з монокультурою кукурудзи. Максимальна частка бактеріальних агентів становила 14%. Найменші показники демонстрували ґрунтові зразки, відібрані з орної ділянки на якій по черзі вирощували 2 культури: кукурудзу та сою [14]. Науковці з Китаю відзначали подібну динаміку на основі дослідження кількості представників *Firmicutes* в ґрунті, де довгий час вирощували тільки огірки. Таким чином, значний розвиток мікроорганізмів фіксувався на ділянках з довготривалою безперервною обробкою (15 та 22 роки відповідно), а не з короткотривалою (лише рік посіпль). Така ж ситуація спостерігалася з кавовими деревами, тобто бактерії були більш поширені в ґрунтах, де довгостроково вирощували рослини [15].

Часто дослідники спираються лише на методи обробітку ґрунту та недостатньо вивчають його фізико-хімічні властивості. Внаслідок цього результати певної частки експериментів не є достатньо об'єктивними. На даний час не у всіх дослідженнях підведено конкретний підсумок щодо причини існування виняткових ситуацій, де більший відсоток мікроорганізмів спостерігається у ґрунтах з монокультурою, ніж у землях із сівозміною.

Доведено, що існує взаємозалежність між розповсюдженням відділу *Firmicutes* та вмістом фосфору, бромю, калію в легкозасвоюваній формі. Дані хімічні елементи позитивно впливають на ріст бактеріальних агентів. Варто зазначити, що дослідження впливу довгострокового монокультурного вирощування бавовни (20 років) підтвердило, що електропровідність ґрунту безпосередньо впливає на частку мікроорганізмів в середовищі [16].

Тип добрив також позначається на різноманітності представників відділу *Firmicutes* та бактерій роду *Bacillus*. Ці мікроорганізми споживають велику частку органічного вуглецю, азоту та інших поживних речовин, які є основою для метаболічних перетворень, продукування важливих біологічно активних сполук [17].

Вчені виявили вищий відсоток мікробних таксономічних одиниць в орному ґрунті, який був збагачений мікро- та макроелементами внаслідок внесення добрив. На названому середовищі по черзі вирощували рис та рапс, тобто було використано сівозміну. Найкращі результати демонструє збагачення ґрунту комплексом натрію, фосфору, калію та соломи [18]. Схожий експеримент характеризувався подібними результатами. В ході його проведення встановлено, що кількість бактерій відділу *Firmicutes* зростає до 10% від загальної кількості мікроорганізмів при внесенні азотних добрив [19]. В разі збагачення ґрунту навозом також відбуваються позитивні зрушення. В певних випадках довгострокове застосування навозу в якості джерела органічного живлення є навіть ефективнішим, ніж додавання мінеральних добрив [20]. Деякі науковці вважають, що правильний вибір типу добрив, чи навозу сильніше впливає на

чисельність *Firmicutes*, ніж такі агротехнічні заходи як сівозміна, чи монокультурне вирощування рослин [21].

На чисельність представників *Firmicutes* в ґрунті також впливає застосування засобів захисту рослин. Тому результати описаних досліджень також здатні корелюватись зі зміною та непостійністю сільськогосподарських практик. Варто звернути увагу на різницю видів ґрунтів залежно від місця проведення експерименту. Не зважаючи на те, що бактерії роду *Bacillus* поширені майже у всіх типах ґрунтів, деякі землі всеодно є більш сприятливими для знаходження мікроорганізмів у фазі активного росту.

1.3. Синтез біологічно активних речовин *Bacillus spp.*

1.3.1. Продукування антибіотиків бактеріями роду *Bacillus*

Антагоністична активність бактерій роду *Bacillus* обумовлена здатністю до синтезу вторинних метаболітів, які мають антибіотичну дію. Дані сполуки є пептидами, для яких притаманна низька молекулярна маса та поділ на 2 ключові групи – бактеріоцини (рибосомальний синтез речовини) та пептиди, ліпопептиди, полікетиди (нерибосомальний синтез).

Бактеріоцини – найпоширеніший клас бактеріальних антибіотиків, що пригнічують ріст фітопатогенів і навіть тих, що набули системну стійкість до інших сполук, які інгібують їх розвиток. Дія бактеріоцинів починається з порушення синтезу клітинної стінки мікроорганізмів, утворення пор в мембрані за допомогою клітин-мішеней. Антимікробний механізм цих антибіотиків сконцентрований на нанесенні шкоди видам, які близькі за приналежністю до роду, мають вузький спектр дії [22]. Окрім бактеріоцинів фіксується продукція подібних речовин (амілолізин, субтилін, туріцин, субтилозини А та Б, амізін) п'ятьма видами роду: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*. Виділення та дослідження як бактеріоцинів, так і подібних до них сполук використовують з метою захисту

рослин для пригнічення чужорідних мікроорганізмів, які ушкоджують тканини культурних видів. Проте, варто відзначити, що пептиди та ліпопептиди, які є антибіотиками нерибосомальної природи виявляють сильніший антимікробний ефект [23, 24].

Циклічні ліпопептиди хоча й займають друге місце за продукуванням в бактеріальній клітині (після бактеріоцинів), але вони є найбільш вивченим класом антибіотиків *Bacillus spp.*. Сполуки пригнічують велику кількість фітопатогенів, а їх синтез проводиться нерибосомальними пептидсинтетазами. Механізм дії схожий з бактеріоцинами, він включає зміну в структурі мембрани клітин патогенних організмів, порушення її проникності шляхом деградації, солюбілізації, формування пор. Ліпопептиди здатні вступати у взаємодію з нуклеїновими кислотами, а в особливості ДНК. Наведений клас антибіотиків напряду впливає на колонізацію представниками роду *Bacillus* ризосфери, активізує захисні механізми рослин [24].

Циклічні ліпопептиди – це сполуки родин фенгіцина, сурфактина, ітуріна. До їх складу входять амінокислоти, а також гідрокси- та аміножирні кислоти, які характеризуються різноманітною довжиною вуглецевих ланцюгів. Сурфактинові сполуки (сурфактин, пумілацидин, ліхенізин, галобацилін, бамілоцин) є гептапептидами, які синтезуються *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*. Сурфактини інгібують ріст та розвиток мікроміцетів, деяких фітопатогенних бактерій. Ітурінові сполуки (ітурін, бациломіцин, мікосубтілін, бацилопептини, субтулен, міксирини) теж є гептапептидами. Їх продукція притаманна *Bacillus pumilus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus vallismortis*. Ітуріни виявляють антагонізм відносно грибних агентів та бактерій (проте в цьому разі антибіотики діють слабше). Фенгіцинові сполуки (фенгіцин, мальтацин, пліпастатин) є декапептидами, що синтезуються *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*. Фенгіцини унеможливають розвиток грибкових хвороб на культурних рослинах [25].

Ліпопептиди, які мають нерибосомальне походження включають поліміксини, тіроцидини, граміцидини, курстакіни, бацитрацини. Курстакіни – гептапептиди (лінійні або циклічні), продуцентами яких є *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*. Вони порушують цілісність мембран мікроміцетів та грибів [26]. Бацитрацини – циклічні декапептиди, що синтезуються *Bacillus sonorensis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*. Проявляють найбільшу активність відносно грампозитивних бактерій [27]. Поліміксини – циклічні декапептиди, які продукує лише один представник роду (*Bacillus polymyxa*). На відміну від бацитрацинів, цей клас пригнічує грамнегативні бактерії. Граміцидини та тіроцидини синтезуються *Bacillus brevis* та ефективно пригнічують як грамнегативних, так і грампозитивних бактеріальних агентів [28].

Доведено, що певні ізоляти роду *Bacillus* продукують нерибосомальні антибіотичні речовини, а саме: пептиди (амікумацин, дикетопіперазини, ризоктицин, мікобацилін, бацилізин) та полікетиди (дифіцидин, бацилаен, дигідробацилаен, макролактин), що є ефективними для боротьби з мікроміцетами та бактеріями [29].

Вивчена можливість бактерій *Bacillus subtilis* та *Bacillus amyloliquefaciens* продукувати понад 20 різноманітних антибактеріальних сполук. 4-5% і 8% генетичної ємності кожного з мікроорганізмів виділено для синтезу вторинних метаболітів. Розглядаючи навіть цих 2 представників роду *Bacillus* вже стає зрозумілим перспектива використання їх як антимікробних агентів [25]. Досліджуючи інші види *Bacillus spp.*, які продукують антибіотики, виявлено антимікробний ефект широкого спектру дії. В основному бактерії синтезують сполуки, що належать до одного сімейства, проте деякі штами є співпродуцентами різних сполук. Антимікробна дія мікроорганізмів роду *Bacillus* залежить від особливостей процесу продукування антибіотичних речовин [30].

Раніше названі *Bacillus subtilis* та *Bacillus amyloliquefaciens* внаслідок синтезу антимікробних сполук активно борються з такими захворюваннями

рослин як фузаріоз зубків часнику і колосова гниль пшениці. При дослідженні *Bacillus amyloliquefaciens* зазначено, що даний мікроорганізм здатний продукувати як сполуки рибосомальної природи (бактеріоцини), так і нерибосомальної (сурфактин, фенгіцин), а також сприяти пригніченню та знищенню як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій. Є ефективним проти *Fusarium oxysporum*, *Fusarium avenaceum* та *Mucor sp.* [31].

В свою чергу, *Bacillus subtilis* має протигрибкову дію та пригнічує *Pythium ultimum* завдяки своїй можливості синтезувати ітурін та фенгіцин. Деякі штами *Bacillus amyloliquefaciens* також продукують ітурін, який виступає агентом біологічного контролю проти *Verticillium dahliae*. Ліпопептиди цих 2 представників роду *Bacillus* (ітурін, сурфактин, фенгіцин) знищують грибок *Sclerotinia sclerotiorum*. Окрім цього, окремі штами *Bacillus amyloliquefaciens* та *Bacillus pumilus* майже повністю зупиняють зараження буряка мікроорганізмом *Pseudomonas syringae pv. aptata* [32].

Bacillus subtilis пригнічує негативну дію на корені пшениці грибка *Gaeumannomyces graminis var. tritici* за допомогою ітуріна, пліпастатина, сурфактина та бациломіцина. Сурфактин, який синтезується *Bacillus licheniformis*, пригнічує розвиток пірикуляріозу рису спричиненого *Magnaporthe grisea*. *Bacillus pumilus* є агентом біологічного контролю грибків *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Sclerotium rolfsii* через синтез пумілацидину [33].

1.3.2. Синтез ферментів *Bacillus spp.*

Окрім продукції антибіотиків, антимікробні властивості бактерій роду *Bacillus* обумовлені синтезом гідролітичних ферментів (глюканази, хітинази, целюлази, хітозанази, протеази, ліпази). Вони спричиняють гідроліз складових клітинних стінок як бактерій, так і мікроміцетів.

Хітинази є глікозидгідролазами, які проводять розрив β -1,4-глікозидних зв'язків у природному полісахариді – хітині. Він займає другу позицію по розповсюдженню серед полісахаридів та входить до складу клітинних стінок

грибних агентів. Продукція бактеріальних хітиназ відбувається з метою забезпечення живлення та енергії мікроорганізмів шляхом деструкції хітину. Певні типи хітиназ використовуються в галузі захисту рослин для інгібування росту мікроміцетів [34].

Хітозанази також належать до класу глікозидгідролаз. Вони відповідають за розщеплення β -1,4-глікозидних зв'язків у хітозані (похідна хітину). Хітозанази є корисними при перебігу процесів рециркуляції азоту та карбону. Спираючись на те, що хітозан, як і хітин є складовою клітинних стінок грибів, його застосовують для біологічного захисту культурних рослин від дії патогенних мікроміцетів [35, 36].

Глюканази – глікозидгідролази, які приймають участь в деградації глікозидних зв'язків, що розташовуються в α - та β -глюканах. Хоча α -1,3-глюкан є цілком замінною складовою клітинних стінок, він є необхідним для інтенсифікації процесів клітинного поділу та вегетативного росту деяких видів грибних агентів. Розглядаючи β -1,3-глюкан варто зазначити, що він займає третю сходинку за розповсюдженням після хітину. Глюкани виконують не тільки структурну функцію, а й здатні виступати джерелом живлення у разі безпосередньої деструкції. Описані ферменти були ідентифіковані у п'яти видах родини *Bacillus*, а саме: *Bacillus subtilis*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus brevis*, *Bacillus licheniformis* [37].

Клітинні стінки фітопатогенних мікроміцетів також містять ліпіди, целюлозу та білкові сполуки, тому ліпази, целюлази та протеази *Bacillus spp.* спричиняють деградацію оболонки. Результат деструкції клітинних структур залежить від активності не одного конкретного ферменту, а групи сполук. Спочатку відбувається залучення хітиназ до процесу, а потім – глюканаз. Фунгіцидна дія сягає максимуму за умови правильно підібраних комбінацій ферментів, належних умов навколишнього середовища [38].

Згідно з дослідження, *Bacillus subtilis* через здатність до синтезу хітиназ є ефективним в контролі *Rhizoctonia solani*. *Bacillus amyloliquefaciens* продукує

протеази, які пригнічують *Fusarium oxysporum*. До того ж, цей вид виробляє комбінацію літичних ферментів (ліпаза, хітиназа, целюлаза, протеаза), що інгібують ріст *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis*. Ця ж комбінація (за виключенням ліпази) відповідає за нанесення фатальної шкоди *Fusarium verticillioides* (збудник гнилей кукурудзи). Ферменти класу гідролаз, що синтезуються видом *Bacillus velezensis*, пригнічують розвиток *Botrytis cinerea* (викликає сіру гниль перцю) [39].

1.3.3. Мікроорганізми роду *Bacillus* в ролі продуцентів сидерофорів

Сидерофори – група хелатуючих металів. Сполуки класу представляють собою пептиди нерибосомальної природи, які характеризуються низькою молекулярною масою. Часто продуцентами виступають мікроорганізми та рослини, що знаходяться в стані залізодефіциту. В свою чергу, залізо – це елемент, який приймає участь в процесах синтезу нуклеїнових кислот (РНК та ДНК), метаболічних перетвореннях кисню, ферментативних циклах, перенесенні електронів. Значення сидерофорів – переведення заліза у форму хелату (хелатування), що дозволяє солюбілізувати ферум та виділяти його зі сполук органічної природи, мінералів. У сфері захисту рослин сидерофори знижують доступність кисню для мікроорганізмів, в тому числі й патогенних форм мікроміцетів, бактерій. Внаслідок можливості виникнення дефіциту фітопатогени вступають в пряму конкурентну взаємодію.

Сидерофори *Bacillus spp.* здатні відновлюватись та переміщатись до клітин рослин по провідним тканинам. Інша можливість мікробних сидерофорів – хелатування заліза з ґрунтового середовища та обмін лігандами з сидерофорами рослин. Такі зв'язки забезпечують кращий ріст культур. Окрім ключових властивостей, сидерофори з'язують метали, тому їх використовують при проведенні біоремедіації забруднених ґрунтів [40].

Існує три основних групи сидерофорів:

- Катехолати – це група, сполуки якої продукуються більшістю бактерій. Доведено, що *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* синтезують бацилибактин [41].
- Гідроксамати.
- Карбоксилати [39].

До ключових сидерофорів, продуцентами яких є представники *Bacillus spp.* належать піовердин, шизокінен, піохелін, петробактин. Відповідно до наукових даних, *Bacillus subtilis* внаслідок синтезу сидерофорів пригнічує *Fusarium spp.* (спричиняє фузаріоз перцю) [42]. Сидерофори в комплексі з ліпопептидами краще інгібують розвиток хвороб культурних рослин. Оскільки *Bacillus subtilis* продукує не лише сидерофори, а й целюлази та хітинази, він є важливим бактеріальним агентом в подоланні *Bipolaris sorokiniana* [43]. Біологічний контроль відносно мікроміцетів, що здійснюють бактерії роду *Bacillus* наведено в табл. 1.3.

Таблиця 1.3

Біологічний контроль *Bacillus spp.*

Вид бактерії	Механізм дії	Цільовий патоген	Хвороби рослин
<i>Bacillus subtilis</i>	Ітурін, фенгіцин	<i>Pythium ultimum</i>	Відмирання бобів
<i>Bacillus subtilis</i>	Сидерофори	<i>Fusarium oxysporum f. sp. capsici</i>	В'янення перцю
<i>Bacillus subtilis</i>	Літичні ферменти, сурфактин	<i>Fusarium spp.</i>	Гниль зубчиків часнику
<i>Bacillus subtilis</i>	Хітиназа	<i>Rhizoctonia solani</i>	Ризоктоніоз картоплі, рак стебел
<i>Bacillus subtilis</i>	Літичні ферменти, сидерофори	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Плямистість пшениці
<i>Bacillus subtilis</i>	Сурфактин, бациломіцин, ітурін, пліпастатин	<i>Gaeumannomyces graminis var tritici</i>	Кореневі гнилі пшениці
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Протеаза	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	В'янення томатів
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Ітурін	<i>Verticillium dahliae</i>	В'янення бавовни

<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Хітиназа, целюлаза, протеаза, ліпаза, сидерофори	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Бактеріальний рак томатів
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Фенгіцин, сурфактин, бактеріоцини	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium avenaceum</i> , <i>Mucor sp.</i>	Широкий спектр хвороб овочів та всіх груп польових культур
<i>Bacillus velezensis</i>	Хітиназа, глюканаза, протеаза, целюлаза	<i>Botrytis cinerea</i>	Сіра гниль перцю
<i>Bacillus licheniformis</i>	Сурфактин	<i>Magnaporthe grisea</i>	Пірикуляріоз рису
<i>Bacillus sp.</i>	Сидерофори, глюканаза, протеаза, хітиназа	<i>Fusarium verticillioides</i>	Гнилі качанів та стебел кукурудзи
<i>Bacillus sp.</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Сидерофори, ітурін, сурфактин, фенгіцин	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Біла пліснява квасолі
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Сурфактин, ітурін, фенгіцин	<i>Fusarium graminearum</i>	Флегмона пшениці
<i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Ліпопептиди	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. aptata</i>	Плямистість листя буряка

1.4. Стимулювання росту рослин бактеріями *Bacillus spp.*

1.4.1. Доступність поживних речовин

Вторинні метаболіти бактерій роду *Bacillus* посилюють доступність необхідних речовин для росту рослин, одержання вищих врожаїв. Як відомо, мінеральні добрива сприяють збагаченню ґрунтового середовища карбоном, нітрогеном, калієм та іншими важливими іонами, проте цей шлях є економічно не вигідним для аграріїв. Біодобрива на основі штамів *Bacillus spp.*, що фіксують атмосферний азот та розщеплюють фосфоровмісні сполуки, є більш дешевим підходом, при використанні якого мінімізується негативний вплив на агроценоз. Подібні штами активізують ріст культурних рослин [44].

Для фіксації атмосферного азоту мікроорганізми продукують спеціальний фермент – нітрогеназу, яка приймає участь в перетворенні динітрогену в аміак. Рослини поглинають NH_3 за допомогою корневих структур. Азотфіксатори є вільноіснуючими, чи мікроорганізмами, що вступають в симбіотичну взаємодію з рослинами. Згідно з дослідженнями, *Bacillus pumilus* – це представник роду,

який підвищує вміст нітрогену в кукурудзі, що сприяє наростанню маси культури. Дослідники припускають, що за фіксацію азоту в *Bacillus spp.* відповідає ген *nifH*. Активність нітрогенази спостерігається у *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus brevis* [45].

Інший важливий для розвитку рослин елемент – фосфор. Багато видів не засвоюють його через перебіг процесів осадження, адсорбції та конверсії. Мікроорганізми здатні розщеплювати неорганічні фосфати та мінералізувати органічний фосфор. Механізм дії базується на синтезі бактеріальних сидерофорів, кислот, як органічного, так і неорганічного походження, вуглекислого газу та гідроксильних іонів, що відповідають за хелатування та створення лужного середовища при якому вивільняється фосфор. Ключові ферменти, які мінералізують органічні форми фосфатів – це фітази, фосфоліпази та фосфатази [46].

Представники *Bacillus spp.* відзначаються можливістю синтезувати широкий спектр органічних кислот. *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* є продуцентами молочної, глюконової та оцтової кислот які активізують вивільнення органічного фосфору. Ізоляти *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* і *Bacillus subtilis* окрім названих кислот продукують ще й пропіонову, капронову, ізокапронову, ізомаляну та гептанову кислоти, що солубілізують фосфор. Висунуто припущення, що один і той самий бактеріальний штам може відповідати як за розчинення, так і за мінералізацію фосфору [47].

1.4.2. Виробіток фітогормонів

Збільшення урожайності культур при використанні мікроорганізмів роду *Bacillus* обумовлено здатністю бактерій виробляти абсцизову кислоту, ауксини, цитокініни, етилен та гібереліни.

Bacillus spp. синтезують найвідоміший ауксин – ІОК та використовують його при симбіозі з рослинним організмом. Відомо, що *Bacillus subtilis* позитивно

впливає на ріст пагонів, кореневищ, формування листя у томатів та підвищує коефіцієнт проростання насіння. Представники роду *Bacillus* регулюють функціонування генів, що виявляють чутливість до ауксинів, тому фіксується розвиток бічних та основних коренів [48].

Підтверджено, що 2 види, а саме: *Bacillus licheniformis* та *Bacillus pumilus* продукують велику кількість гіберелінів. *Bacillus methylotrophicus* також синтезує ряд рослинних гормонів даного класу, що показано в дослідженнях зі збільшення частки проростання насіння дині, гірчиці, салату та сої. При цьому спостерігається подовження пагонів, наростання їх маси, збільшення ширини листових пластин, підвищення відсотка амінокислот, білків, каротиноїдів, макро- та мікроелементів, хлорофілу [49].

Bacillus subtilis виробляє цитокініни, тому інокуляція рослин штамами виду збільшує частку цих фітогормонів у тканинах, підвищує вагу корневих структур, пагонів. Відповідно до праць науковців, *Bacillus megaterium* продукує цитокініни та прискорює ріст *Phaseolus vulgaris*, *Arabidopsis thaliana*, рослин сої [50].

Шлях синтезу етилену мікроорганізмами досі до кінця не встановлений, проте відомо, що *Bacillus spp.* продукує 1-аміноциклопропан-1-карбоксилат дезаміназу, яка регулює рівень фітогормону в рослинах. Цей фермент відповідає за деградацію сполуки-попередника етилену з утворенням α -кетобутирату та аміаку. АЦК-дезаміназа допомагає рослинам пристосовуватись до умов біотичного та абіотичного стресу. Багато видів роду *Bacillus* мають АЦК-дезаміназну активність [51].

Bacillus aryabhattai синтезує багато сполук класів цитокінінів, гіберелінів, а також АБК та ІОК. Рослини сої, які замочували в біопрепараті, що містив даний вид бацил, характеризувались розвиненою кореневою системою, сформованими пагонами, стійкістю до дії високих температур, окислювального стресу. *Bacillus amyloliquefaciens* є продуцентом АБК, тому стимулює ріст рослин та посилює стійкість до засолення ґрунту, стресу [52].

1.5. Препарати-біопротектори на основі бактерій роду *Bacillus*

Біопротектор – це засіб захисту рослин, активною речовиною якого є сполуки, що синтезуються біологічними агентами (бактерії, гриби) та основною ціллю якого є захист культур від шкідників, хвороб та патогенних форм мікроорганізмів. Біопротектори не містять агресивних хімікатів та є альтернативою хімічним пестицидам, сприяють підтриманню біологічної рівноваги сільськогосподарської екосистеми.

Bacillus subtilis – бактеріальний агент на основі якого створено найбільшу кількість біофунгіцидів. На ринку України представлені ФітоХелп, МікоХелп, Фітодоктор (Спорофіт), Спектрал, Флорабацилін, Фітоцид, Бактофіт, Серенада АСО, Інтеграл ПРО, які включають даний мікроорганізм та біологічно активні сполуки, які він продукує.

ФітоХелп містить кілька штамів *Bacillus subtilis*, а також комплекс вітамінів, ферментів, токсинів, що виявляють дію відносно патогенних бактерій та мікроміцетів. Його застосовують з метою подолання стресу культурних рослин, який викликаний біотичними та абіотичними факторами. Хвороби при яких доцільно використовувати біопрепарат: ризоктоніоз та фітофтороз картоплі, несправжня борошниста роса, сіра та біла гниль як плодових, так і ягідних культур, фузаріоз, іржа, альтернаріоз, мільдю, оїдіум. Штами *Bacillus subtilis* фіксують атмосферний азот, переводять його та фосфор в легкозасвоювану для рослин форму, активізують живлення рослин необхідними макро- та мікроелементами.

МікоХелп – це суміш грибів *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma viride* та бактерій виду *Bacillus subtilis*, родів *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Azotobacter*. Ціль застосування – інгібування мікроміцетів родів *Pythium*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Fusarium*, що є збудниками стеблових, кореневих та плодових гнилей. Також його застосовують для подолання ризоктоніозу, бактеріозу, альтернаріозу, фітофторозу. Кожен мікроорганізм консорціуму має власну роль.

Bacillus subtilis, *Trichoderma* та *Enterococcus* пригнічують ріст і розвиток фітопатогенних мікроміцетів. *Azotobacter* є азотфіксатором, що перетворює атмосферний азот в аміак, який засвоюють рослини. *Enterobacter* спрямований на перетворення недоступного калію та фосфору в більш прості сполуки, які потрапляють до культур через кореневі структури. Внаслідок продукування фітогормонів бактерією *Bacillus subtilis* покращується стан основного кореня, спостерігається поява великої кількості бічних.

Спектрал містить штам МВІ 600 *Bacillus subtilis*, проявляє фунгіцидну та інсектицидну дію. Також до складу входить метилжасмонат. Як відомо, рослинні організми виробляють його та жасмонову кислоту у відповідь на стрес, який викликаний несприятливими умовами навколишнього середовища, дією патогенів, шкідників. Метилжасмонат змушує культуру синтезувати нікотин, антимікробні фітоалексини, інгібітори протеаз. Останні взаємодіють з травною системою комах таким чином, щоб шкідники не використовували рослинні сегменти для власного харчування [53].

До складу Фітодоктора входять живі клітини та спорові форми штаму BS 323 *Bacillus subtilis*. Біопрепарат характеризується фатальним ефектом для *Botrytis*, *Fusarium*, *Erwinia*, *Phytophthora*, *Pyrenophora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Septoria* та інших. Окрім антибіотичних сполук бактеріального агента фіксується наявність фітогормонів та амінокислот. Синергетично взаємодіє з біопрепаратами «Триходермін», «Гаубсин» та «Целюлад». Доцільно застосовувати навіть в профілактичних цілях [54].

Фітоцид містить спори та живі клітини *Bacillus subtilis*. Використовується для усунення фітофторозу, борошнистої роси, парші, іржі, корневих гнилей, чорної ніжки. Для нього притаманна фунгіцидна, антибактеріальна дія, а деякі вторинні метаболіти приймають безпосередню участь в процесах перетворення недоступних для рослин форм мінеральних та органічних речовин у доступні гумус, азот, фосфор, які підживлюють культури. Бактерії роду *Bacillus* сприяють

встановленню системної стійкості рослин до захворювань та зменшують ймовірність повторного зараження [55].

До складу біопрепарату Флорабацилін входить *Bacillus subtilis*, тому речовина пригнічує розвиток патогенних мікроміцетів, виконує функції стимулятора росту, азотфіксатора та фосфатмобілізатора. Хвороби, проти яких використовується засіб захисту рослин – кореневі гнилі, сажка, фузаріоз, борошниста роса, парша, іржа, фітофтора. При внесенні препарату відбувається підвищення коефіцієнту схожості насіння, формування високорозвинених корневих структур, посилення фотосинтетичної активності, пришвидшений ріст генеративних органів. Культури стають стійкими до посушливих умов, хвороб [56].

Серенада АСО – біопрепарат на основі штаму QST 713 *Bacillus subtilis*. Ліпopeптиди у його складі інгібують ріст та розвиток патогенних мікроміцетів. Антибіотичні речовини чинять бактерицидну дію. Відбувається індукція системної стійкості культур. Варто зазначити, що мікроорганізми не набувають резистентності до засобу [57].

Інтеграл ПРО зроблений на основі штаму MBI 600 *Bacillus subtilis*. При його використанні рослини ще 1-1,5 місяці не уражають захворювання, які викликані *Pythium spp.*, *Fusarium spp.*, і *Rhizoctonia spp.*. Біопрепарат покращує стан коренів та поглинання поживних речовин навіть у неналежних умовах [58].

1.6. Проблеми та перспективи препаратів на основі *Bacillus spp.*

Першою ключовою проблемою варто вважати вплив умов навколишнього середовища на ефективність штамів бактерій роду *Bacillus*. Хоча єдиних оптимальних умов для розвитку всіх видів немає, проте при дослідженні культуральних ознак виявлено, що *Bacillus subtilis* (найпоширеніший агент в захисті рослин) росте при рН на рівні 6,8-7,6. Звичайно, є штами для яких підходить й рН, що еквівалентний значенню 5,5-6,5, але можна зробити

висновок, що ізоляти не здатні існувати в сильнолужному, чи сильнокислому середовищі. Подібна ситуація спостерігається і з температурою. Вплив показників, що становлять менше 15 °С є згубним для *Bacillus spp.*. Найкращий розвиток фіксується при температурах вище 30 °С, тому різкі зміни, а в особливості похолодання та наявність негативних температурних значень викликають загибель штамів [59].

Препарати, які містять живі клітини, спорові форми та вторинні метаболіти мікроорганізмів роду *Bacillus* не завжди інгібують ріст та розвиток широкого кола патогенів. Властивості залежать від конкретного виду та штаму. Наприклад, *Bacillus subtilis* застосовують для пригнічення бактерій та грибів, проте кожен біопрепарат має в складі конкретний штам, що краще діє відносно одних видів та гірше відносно інших. До того ж, бактерії краще використовувати на початкових етапах ураження рослини, оскільки при сильному пошкодженні тканин культури препарати на основі мікроорганізмів можуть бути неефективними. Місцеві консорціуми здатні вступати у конкурентну взаємодію зі штамми *Bacillus spp.*, що є негативним фактором для колонізації ґрунтового середовища [32, 38, 53].

Для розширення спектру дії потрібно виробляти біопрепарати, що містять не лише клітини та спори бактерій роду *Bacillus*, а й до складу яких входять інші бактерії, чи мікроміцети. Певна кількість таких засобів уже є на ринку України (приклад – МікоХелп), але їх кількість все ще недостатня. У разі створення штучних консорціумів біопрепарат буде краще боротися з фітопатогенами, інтенсифікувати ріст культур за рахунок швидшого формування вегетативних та генеративних органів, поліпшення доступності основних макроелементів для рослини, активізувати системну стійкість до біотичних та абіотичних стресових факторів [53].

Оскільки термін зберігання мікробіологічних засобів є відносно обмеженим, доцільно виробляти нові форми біопрепаратів (гранульовані, інкапсульовані), а не лише суспензії, чи використовувати більш витривалі штами.

Впровадження селекції, індукованого мутагенезу дозволяє створювати види, які краще реагують на стрімкі зміни умов та не втрачають здатність синтезувати цінні антибіотики, ферменти, сидерофори, фітогормони.

Заради покращення темпів виробництва препаратів пропонується впровадити масштабне виробництво з використанням біореакторів. Застосування методу передбачає не тільки збільшення виходу біомаси, а й залучення високопродуктивних штамів зі сталими генетичними властивостями. Для покращення життєздатності мікроорганізмів роду *Bacillus* в орних ґрунтах доцільним є залучення природних носіїв (торф, вермикуліт, цеоліт) [60].

Отже, не зважаючи на перешкоди, мікроорганізми роду *Bacillus* є високоперспективними біопротекторами, які доречно застосовувати з метою захисту рослин.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Виділення ізолятів мікроорганізмів із ґрунтів органічного виробництва.

Зразки ґрунту були відібрані з ділянок Сквирської дослідної станції органічного землеробства за загальноприйнятим методом. Так, відбір проб ґрунту здійснювали на кількох ділянках органічного землеробства площею по 100 м². Для цього було обрано три точки на кожній ділянці, знято верхній шар (товщина 2 см) та спеціальним шпателем вилучено невелику кількість ґрунту з більш глибокого пласту. Проби переносили в невеликі скляні стерильні банки, закривали корковою пробкою. Необхідно, щоб взяті зразки перемішалися між собою всередині ємностей. Використані шпателі стерилізували в дезінфікуючому розчині (70% етиловий спирт) та автоклаували.

Підготовка зразків передбачала видалення сторонніх частинок (корені рослин та інші включення як органічної, так і неорганічної природи). Не зважаючи на те, що іноді проби витримують в холодильнику одну-дві доби після відбору, для точності результатів аналіз здійснювали безпосередньо в день відбору зразків [61].

2.1.1. Приготування ґрунтової суспензії та посів мікроорганізмів

Для початку на стерильному склі зважували по 10 г ґрунту з кожної банки.

Потім його розтирали в порцеляновій ступці та просіювали через сито. Надалі наважку вносили до колби об'ємом 250 мл та додавали 90 мл стерильної води, збовтували протягом 10 хв та відстоювали приблизно 2 хв.

Оскільки відношення кількості ґрунту до загальної маси суміші в першій колбі становить 1:10, то відповідно отримали розведення 10⁻¹. Наступні розведення (10⁻², 10⁻³ і так далі) готували шляхом перенесення 1 мл суспензії

сAMPLером з першої колби в другу, яка заповнена водою (100 мл), а з другої – в третю.

Зважаючи на те, що в дослідженні застосовували щільні поживні середовища, висів здійснювали поверхнево. Тобто за допомогою дозатора (автоматичної мікропіпетки) на поверхню наносили 1 мл ґрунтової суспензії з обраного розведення та рівномірно розподіляли шпателем Дригальського. Відкриті чашки Петрі знаходились у вертикальному положенні максимально близько до полум'я пальника. Посів кожного розведення (в нашому випадку від 10^{-1} до 10^{-6}) проводили на 10 чашок. Стандартними для ідентифікації бактеріальних колоній з орних ґрунтів на середовищах Чапека та МПА вважаються розведення 10^{-3} і 10^{-4} , проте з метою оцінки антагоністичної активності та виділення *Bacillus spp.* було використано більшу кількість серійних розведень [61]. Виконання методу серійних розведень наведено на рис. 2.2.



Рис. 2.2. Внесення ґрунтової суспензії на поживні середовища

2.1.2. Вирощування на поживних середовищах

Для вирощування фітопатогенних мікроміцетів із музейної колекції Інституту агроєкології та природокористування НААН брали середовище Чапека-Докса складу зазначеного в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Склад поживного середовища Чапека-Докса [62].

Компонент	Концентрація (г/л)
NaNO ₃	2
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄	0,5
KCl	0,5
FeSO ₄	0,01
Глюкоза	30
Агар	15

Для приготування поживного середовища Чапека зважували всі сполуки, вносили їх до колби та додавали 1 л холодної дистильованої води. Одержану в ємності суміш закривали пробкою, ретельно перемішували, а надалі – нагрівали до повного розчинення елементів. Стерилізація здійснювалась вологим жаром в автоклаві за температури 121 °С під тиском 1 атм. Тривалість процесу складала 15 хв. Оптимальна кислотність становила $7,2 \pm 0,2$. рН регулювали шляхом додавання лугу (NaOH), чи кислоти (HCl). Середовище розливали в попередньо простерилізовані чашки Петрі так, щоб воно заповнило приблизно 1/3 від загального об'єму посудини.

Для виділення із ґрунтової суспензії бактерій роду *Bacillus* застосовували середовище МПА склад якого зазначено в табл. 2.2. Процес приготування середовищ наведено на рис. 2.1.

Склад поживного середовища МПА

Компонент	Концентрація (%)
Пептон	0,5
Яловичий, чи дріжджовий екстракт	0,3
Агар	1,5
NaCl	0,5

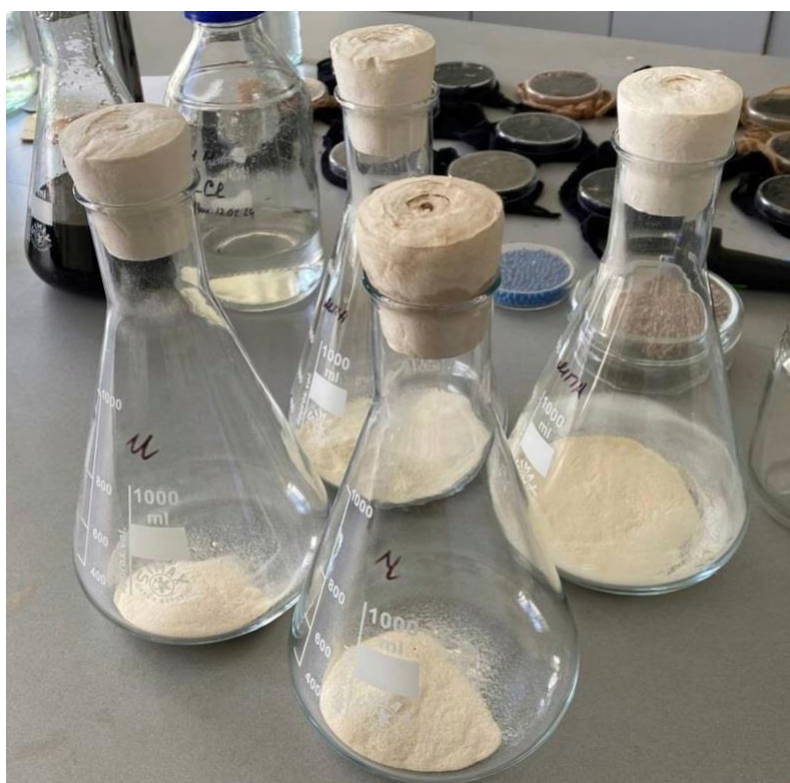


Рис. 2.1. Приготування середовищ (агар Чапека та МПА)

Для приготування середовища готову суміш (30г) перенесли в колбу та залили відповідним об'ємом (1 л) дистильованої води. Отриманий розчин перемішали, закрили пробкою і нагрівали до абсолютного розчинення компонентів та отримання однорідної структури. Стерилізували середовище аналогічно до середовища Чапека (автоклаували при 121 °С під тиском 1 атм протягом 15 хв). рН повинен становити 7,0-7,2. Опісля стерилізації поживне середовище розливали у чашки Петрі.

2.2. Визначення антагоністичної активності мікроорганізмів

Для скринінгу виділених із органічного ґрунту мікроорганізмів-антагоністів було взятого із музейних культур Інституту агроєкології та природокористування НААН відділу агроєкології та біобезпеки, фітопатоген *Fusarium culmorum*.

2.2.1. Метод зустрічних культур

Антагоністичну активність виділених ізолятів мікроорганізмів досліджували методом змішаних (зустрічних) культур на МПА та середовищі Чапека-Докса (в чашках Петрі діаметром 90 мм із об'ємом середовища 10 мл). Чашки Петрі розміщували в термостаті за температури $26\pm 2^\circ\text{C}$. Повторність досліду триразова. Відмічали зовнішній вигляд і тип відносин, використовуючи міліметрову шкалу лінійки.

Для проведення експерименту мікроміцет *Fusarium culmorum* з середовища висівали на одну чашку Петрі із досліджуваним ізолятом. Надалі потенційний бактеріальний антагоніст був перенесений петлею на середовище по обидві сторони від грибного агенту. Посів здійснювався густим штрихом. Контролем слугував мікроміцет на середовищі Чапека-Докса.

Інкубацію чашок Петрі проводили в термостаті за температури $26\pm 2^\circ\text{C}$. Підрахунки робили на 3, 5, 15 та 30 добу культивування. В кожний з описаних днів оцінювали ріст бактерії та гриба, досліджували морфологічні зміни мікроміцета та порівнювали візуальні особливості з контролем, розглядали обмеження росту (чи його відсутність) *Fusarium culmorum* виділеними ізолятами бактерій. Визначали тип реакції та підбивали підсумки за бальною шкалою (Е – придушення одного мікроорганізму іншим, що по шкалі дорівнює п'яти балам, В – низька фунгіцидна дія, відповідає одному балу) [63].

2.2.2. Метод агарових блоків

Обраний метод базується на необхідності перенесення блоків агару з поверхні суцільного мікробного газону на поверхню середовища, яке містить певне число мікроміцетів. Основна ціль експерименту – виявлення зони інгібування та визначення її розмірів.

Першим кроком було висівання бактеріального агенту штрихом за допомогою петлі на середовище МПА. Надалі чашку Петрі з культурою потенційного антагоніста інкубували в термостаті за температурного значення $26\pm 2^\circ\text{C}$ для утворення суцільного газону. Після одержання високорозвиненої культури з агару вирізали блоки круглої форми, які характеризувались однаковим розміром. Процес здійснювався за допомогою стерильного скальпеля. Тест-культуру мікроміцета переносили на сусло-агар в нову чашку Петрі. Посів виконували штрихом для рівномірного розподілу ізолятів по всій поверхні середовища. Склад використаного сусло-агару зазначено в табл. 2.3 [64].

Таблиця 2.3

Склад сусло-агару [65].

Компонент	Концентрація (г/200 мл)
Солодовий екстракт	15
Пептон	0,75
Мальтоза	12,75
Декстрин	2,75
Гліцерин	2,35
KH_2PO_4	0,4
NH_4Cl	1
Агар	20

Для приготування 200 мл сусло-агару готову суміш (11 г) перенесли в колбу та залили відповідною кількістю (200 мл) холодної дистильованої води.

Одержаний розчин перемішали, закрили пробкою та здійснювали нагрівання для повного розчинення компонентів. З метою стерилізації проводили автоклавування при температурі 121 °С під тиском 1 атм протягом 15 хв. Кислотність готового поживного середовища відповідала нормативному значенню ($5,0 \pm 0,2$). Після етапу стерилізації середовище розливали у стерильні чашки Петрі.

Вирізани блоки, які містили бактеріальних агентів, переносили на сусло-агар, на якому попередньо культивували мікроміцетів. Блоки розміщували на однаковій дистанції один від одного та від країв чашки Петрі. Обов'язковою умовою було розташування круглих сегментів з культурою ростом догори. Чашку Петрі інкубували за температури $26 \pm 2^\circ\text{C}$ в термостаті. Тривалість – 2, 4, 7 діб. В ці дні проводили спостереження та оцінювали зону інгібування росту гриба шляхом вимірювання її діаметру. Застосовували формулу для визначення антагоністичної активності бактеріального агента:

$$A = \frac{D}{d} \quad (2.1)$$

де D – діаметр зони затримки росту міцелію гриба, мм;

d – діаметр місця нанесення культури (становить 6 мм).

Як і при проведенні попереднього прийому (метод зустрічних культур), залишали контрольну чашку Петрі, що містила лише тест-культуру мікроміцета без внесеного бактеріального агента. Порівнювали стандартні параметри росту гриба, його міцелію, а також розвиток мікроміцета в середовищі, де на нього впливають інгібуючі бактеріальні метаболіти [64].

2.3. Ідентифікація бактерій роду *Bacillus*.

Для виділення бактерій роду *Bacillus* використовують різні агаризовані поживні середовища. Оскільки вони є спороутворюючими бактеріями, часто застосовують методи, що сприяють селекції саме цієї групи мікроорганізмів. Так,

наприклад, часто використовують середовище загального призначення - м'ясо-пептонний агар (МПА), що є базовим середовищем, на якому може рости більшість бактерій, включаючи *Bacillus*. Але, для підвищення ймовірності виділення *Bacillus* необхідно застосування селективних середовищ чи факторів. Один із таких методів є використання середовища з підвищеною температурою інкубації, тобто прогрівання суспензії мікроорганізмів при відносно високій температурі (наприклад, 65-70 °С протягом 1-1,5 год) може пригнічувати ріст багатьох неспороутворюючих бактерій, тоді як представники роду *Bacillus* виживають, що нами і було застосовано. Чашки Петрі з посівами прогрітих суспензій інкубують в термостаті при оптимальній температурі для росту бактерій роду *Bacillus* (зазвичай $26 \pm 2^\circ\text{C}$, залежно від виду) протягом 24-48 годин.

Подальша ідентифікація ізолятів виділених з ґрунту органічного землеробства проводилась за культуральними ознаками та включала детальне вивчення характеру і особливостей росту на твердих поживних середовищах, наприклад форма, поверхня, колір і край колоній, їх консистенція та інші тинкторіальні властивості.

Більш детальну фенотипову ідентифікацію ізолятів проводили за морфолого-біохімічним ознакам згідно з методами описаними нижче.

2.3.1. Фарбування за Грамом

Досліджуваним матеріалом слугували бактерії, які проявляли антагоністичну активність. Культуру відбирали з поверхні поживного середовища, переносили на чисте предметне скло та рівномірно розподіляли у краплі фізіологічного розчину. Мікроорганізми обережно перемішували з рідиною для отримання однорідної структури та висушували мазок на повітрі за температури, що еквівалентна кімнатній.

Застосовували фізичний метод фіксації зразків. Для цього предметне скло 3 рази проводили над полум'ям спиртівки та охолоджували на повітрі.

Під час процесу використовували кілька барвників, тому даний тип фарбування є складним. Для початку зразок покривали розчином генціанвіолету та витримували 2 хв. Далі наносили розчин Люголя та аналогічно витримували приблизно 2 хв. Обидві сполуки додавали у розмірі двох крапель, залишки розчину Люголя змивали.

Зразок обробляли 96% етанолом і витримували 25 с після чого проводили промивання. Заради поліпшення візуалізації додавали дві краплі барвника сафраніну, витримували 1 хв та змивали його водою. Зразок висушували за допомогою фільтрувального паперу.

Після виконання всіх етапів предметне скло з бактеріальною культурою досліджували під світловим мікроскопом, що мав імерсійний об'єктив ($\times 1000$). [66]. Різницю між грампозитивними та грамнегативними бактеріями наведено на рис. 2.3.

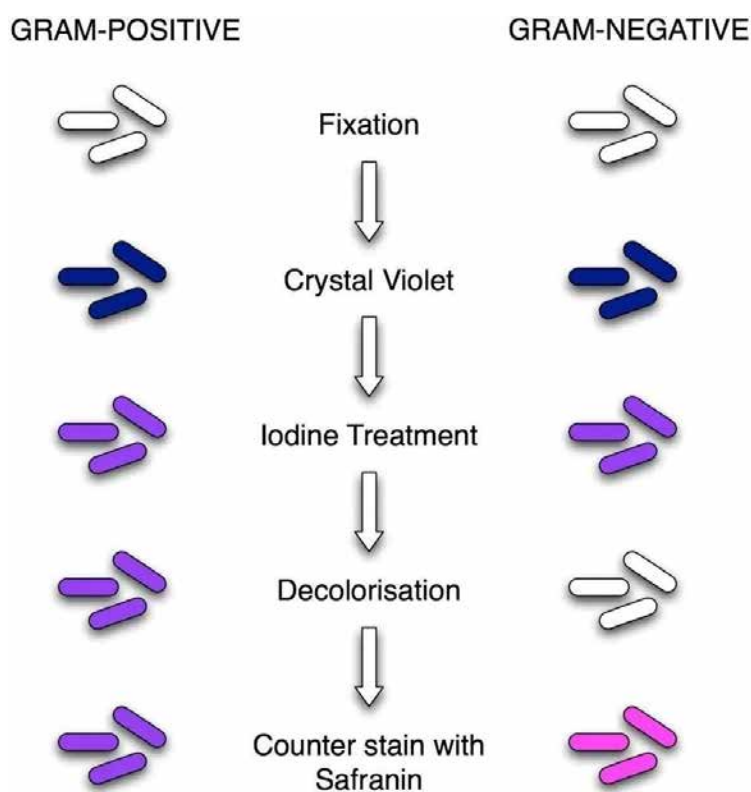


Рис. 2.3. Різниця в забарвленні між грампозитивними та грамнегативними бактеріями на кожному етапі дослідження [67].

2.3.2. Біохімічні тести

Для проведення тесту на каталазу на поверхню бактеріальних колоній, які попередньо вирощувались на поживному середовищі МПА, додавали кілька крапель 3% розчину перекису водню.

Наступним проведеним експериментом було виявлення амілазної активності. Перший етап – приготування 200 мл середовища МПА стандартного складу, що доповнювали 2 г крохмалю. Його стерилізували, розливали у чашки Петрі, а потім здійснювали посів бактерій штрихом. Чашки інкубували за температури 37 °С протягом 2 діб, а надалі додавали розчин Люголя.

Останнім дослідженням була перевірка здатності бактеріальних агентів розщеплювати казеїн. Поживне середовище – трипсиново-соевий агар склад якого зазначено в табл. 2.4 [68].

Таблиця 2.4

Склад трипсиново-соевого агару [69].

Компонент	Концентрація (г/200 мл)
Панкреатичний гідролізат казеїну	3
Папаїновий гідролізат соєвих бобів	1
Агар	3
NaCl	1

Для приготування трипсиново-соевого агару 8 г суміші додали до ємності та залили 200 мл дистильованої води. Отриманий розчин перемішали, закрили пробкою та проводили нагрівання. Стерилізацію здійснювали в автоклаві при температурі 121 °С під тиском 1 атм. Процес тривав 15 хв. рН поживного середовища становив $7,3 \pm 0,2$. Надалі середовище розливали у чашки Петрі.

Бактеріальну культуру наносили на поверхню трипсиново-соевого агару з використанням методу штриха. Чашки інкубували при температурі 37 °С протягом 2 діб [68].

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Підбір поживних середовищ для вирощування мікроорганізмів

Агар Чапека-Докса відповідно до класифікації за складом належать до напівсинтетичних середовищ. Основне спрямування – культивування грибів-сапрофітів (тобто тих, що живляться залишками мертвих частин живих організмів), а також бактерій, які у якості джерела азотного живлення здатні використовувати неорганічні форми азоту.

Ключовими речовинами, які приймають участь в метаболічних перетвореннях всередині мікроорганізмів у середовищі Чапека є NaNO_3 (нітрат натрію в ролі сполуки, яка забезпечує бактерії та гриби азотом) та сахароза (першочергове джерело вуглецю) [61].

Описане поживне середовище було обрано завдяки особливостям його призначення:

- Підходить для ідентифікації мікроорганізмів, що поширені в ґрунтового середовищі.
- Збагачене макро- та мікроелементами, що є необхідними для підтримання оптимальних параметрів росту та розвитку бактерій роду *Bacillus*.
- Зважаючи на те, що воно підходить для культивування грибних агентів, можливим є спостереження за антагоністичною дією бактерій (в нашому випадку *Bacillus spp.*) відносно мікроміцетів.

Спираючись на класифікацію середовищ за призначенням (загальні та спеціальні), варто зазначити, що МПА належить до першого типу. Оскільки середовище є універсальним, то воно підходить для культивування широкого кола мікроорганізмів, в тому числі й бактерій роду *Bacillus*. Окрім цього, в зв'язку з тим, що наведене поживне середовище має достатньо простий склад та високу поширеність, в деяких випадках його використовують в ролі основи для приготування середовищ цільового призначення.

Кожний компонент середовища має особливе значення. Пептон отримують з продукції тваринництва (молоко, м'ясо) шляхом її обробки протеолітичними ферментами, тому він виступає джерелом азоту, амінокислот, вітамінів, жирів. Яловичий та дріжджовий екстракт включає як основні мінерали й вітаміни, так і додаткові поживні речовини, що інтенсифікують ріст мікроорганізмів, наростання біомаси. Хлорид натрію сприяє підтриманню осмотичного балансу, унеможлиблює пошкодження клітинних стінок через різницю зовнішнього та внутрішнього тисків. Як відомо, агар має гелеутворюючу здатність, тому він слугує сполукою, яка відіграє основну роль в одержанні щільних середовищ.

3.2. Морфолого-культуральні ознаки бактеріальних колоній

Первинний відбір колоній ізолятів, морфологічно подібних до *Bacillus* проводився наступним чином, в першу чергу після інкубації проводили візуальний огляд чашок Петрі та відбирали колонії, які за своїми морфологічними ознаками можуть належати до роду *Bacillus*. Характерні ознаки колоній *Bacillus* мають відповідати таким критеріям: можуть бути різного розміру, від дрібних до досить великих (діаметром кілька міліметрів); форму зазвичай мають неправильну, округлу або звивисту; краї колоній можуть бути рівними, хвилястими, лопатевими або іноді мати ризоїдну (коренеподібну) структуру; поверхня колоній може бути плоскою, опуклою, зморшкуватою, сухою, слизовою або зернистою; колір здатний варіювати від білого, кремового до жовтуватого; при дотику стерильною петлею колонії можуть бути пастоподібними, слизовими або сухими.

Так, нами було відібрано ізоляти що мали схожі ознаки. Тобто, за формою колонії переважно були округлими, а їх краї – нерівними. Розмір неоднаковий, наявні як дрібні, так і значно більші колонії. Вони мали гладку поверхню, непрозорі, опуклі. Забарвлення змінювалось від білого до кремового. Виявлено, що приблизно 15% від загальної кількості колоній на середовищі МПА

морфологічно подібні до роду *Bacillus*. Мікроміцетів на середовищі була незначна кількість, тоді як бактерій – більше 70%. Їх забарвлення варіювалось (коричневий, насичений жовтий, помаранчевий кольори) через що при первинній ідентифікації вони не були обрані як потенційні представники роду *Bacillus*.

В свою чергу, колонії, що морфологічно нагадували бактерій роду *Bacillus*, пересівали на нові чашки з відповідним поживним середовищем для отримання чистих культур. З цією метою використовували метод штрихового посіву для отримання ізольованих колоній, що походять від однієї клітини. Цю процедуру повторюють кілька разів для забезпечення чистоти культури. Таким чином для подальших досліджень нами було відібрано п'ять ізолятів, що відповідали всім морфологічним ознакам бактерій роду *Bacillus*. Чисту культуру бактерій роду *Bacillus* наведено на рис. 3.1.



Рис. 3.1. Бактеріальні колонії на середовищі МПА

3.3. Встановлення антагоністичної активності на основі методу агарових блоків

Першим способом, який застосовували для встановлення антагоністичної активності був метод агарових блоків. Обрахунки проводили через 2, 4 та 7 днів культивування. Результати наведено в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Антагоністична активність ізолятів

Номер ізолята	Активність відповідно до доби культивування		
	2 доба	4 доба	7 доба
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0,67	1,5	2,67
5	0,83	2,0	3,33

Відповідно до таблиці, під час проведення спостереження через 2 дні від дати посіву мікроорганізмів бактеріальні ізоляти під номером 1, 2 та 3 не виявляли активності та не пригнічували ріст міцеліальних структур грибних агентів, утворення прозорої зони не фіксувалось. В свою чергу, ізоляти під номером 4 та 5 ймовірно продукували антибіотики, які інгібували розвиток мікроміцетів. Найактивнішим виявився ізолят номер 5, оскільки діаметр зони затримки росту на початку дослідження складав 5 мм, коефіцієнт активності знаходився на рівні 0,83. Ізолят номер 4 мав трохи слабші антагоністичні властивості (діаметр зони – 4 мм та показник активності – 0,67).

Після проходження 4 днів культивування поблизу ізолятів номер 1, 2 та 3 так і не почала формуватися зона пригнічення росту. Варто зазначити, що бактеріальні ізоляти під номером 4 та 5 показували кращі результати, порівняно з попереднім спостереженням. Можна припустити, що продукування вторинних

метаболітів цими штамми продовжувалось. Біля ізоляту номер 5 діаметр зони затримки росту був найбільшим (12 мм), а коефіцієнт активності становив 2,0. Ізолят під номером 4 також показував гарні результати (діаметр прозорої зони 9 мм та показник активності 1,5).

Через тиждень від початку дослідження підбивали підсумки. Ізоляти номер 1, 2 та 3 були неактивними, тоді як антагоністичні параметри ізолятів під номером 4 та 5 лише покращились. Наприкінці експерименту діаметр зони інгібування росту поблизу ізоляту номер 5 становив 20 мм (коефіцієнт активності 3,33), а діаметр зони затримки росту біля ізоляту номер 4 сягав 16 мм (показник активності 2,67).

Таким чином, ізоляти номер 4 та 5, що були виділені з орного ґрунту, є придатними для створення біофунгіцидів. Вони синтезують метаболіти, які пригнічують ріст та розвиток мікроміцетів, що доволі корисно в захисті культурних рослин від несприятливого впливу фітопатогенів. Бактеріальні ізоляти зображені на рис. 3.2.



Рис. 3.2. Інгібування росту грибного міцелію ізолятами *Bacillus spp.*

3.4. Визначення антагоністичної активності на основі методу подвійних (зустрічних) культур

Другим підходом, який використовували для визначення антагоністичної активності був метод подвійних (зустрічних) культур. Для цього *Fusarium culmorum*, який взяли з колекції штамів, культивували з відібраними бактеріальними ізолятами в чашці Петрі. До процесу залучено 2 чашки Петрі з метою порівняння фунгіцидної дії *Bacillus spp.*. Посів в кожному з випадків здійснювали густим штрихом з двох сторін від грибного агента. Підрахунки проводили на 3, 5, 15 та 30 добу дослідження відповідно. Контролем слугував мікроміцет *Fusarium culmorum*, що був окремо висіяний на середовище Чапека-Докса. Результати наведені в табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Характеристика антагоністичної активності *Bacillus spp.* відносно *Fusarium culmorum*

Доба культивування	Тип реакції (перша чашка Петрі)	Тип реакції (друга чашка Петрі)	Бал (перша чашка Петрі)	Бал (друга чашка Петрі)
3	Е	Е	5	5
5	Е	Е	5	5
15	Е	В	5	1
30	Е	В	5	1

Бактерії роду *Bacillus* в першій чашці Петрі стримували ріст бактеріального ізоляту навіть через 30 днів спільного культивування з *Fusarium culmorum*. Позначення «Е» в таблиці означає придушення одного мікроорганізму іншим, що по шкалі дорівнює п'яти балам. Колонія мікроміцету відзначалась неправильною формою та нерівними краями. В центральній частині фіксувалось біле забарвлення, тоді як краї були темно-зеленими, а проміжна зона між центром та краєм характеризувалась сіро-фіолетовим кольором. Колонія непрозора, більш

пухка в центрі, мала виражені міцеліальні структури. Пригнічення мікроміцета бактеріями роду *Bacillus* наведено на рис. 3.3.

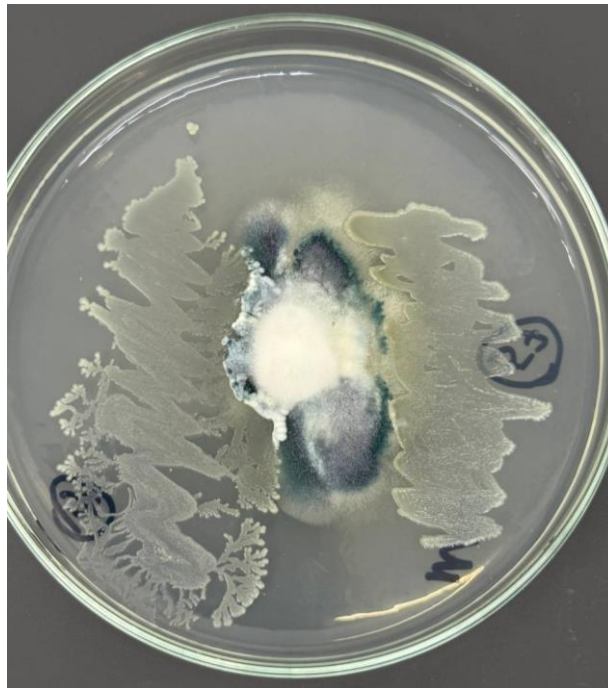


Рис. 3.3. Антагонізм *Bacillus spp.* відносно *Fusarium culmorum*

В другій чашці Петрі бактерії обмежували ріст гриба лише на початкових етапах їх спільного культивування (третій та п'ятий день дослідження). Спостереження за колоніями на 15-ту та 30-ту добу культивування засвідчило заростання поживного середовища *Fusarium culmorum* та майже повну відсутність антагоністичної активності *Bacillus spp.* відносно мікроміцета. Позначення «В» в таблиці вказує на низьку фунгіцидну дію та відповідає одному балу. Грибна колонія мала напівкруглу форму, була непрозорою, виднілись сформовані міцеліальні структури. Колір – переважно білий, але центральна ділянка трохи темніша (світло-коричневе забарвлення). Текстура середнього сегменту більш щільна, а по краях – ватоподібна. Фітопатоген мав достатньо швидкий ріст. Описана колонія відповідала контролю, де *Fusarium culmorum* також характеризувався білим кольором, без сіро-фіолетових та темно-зелених плям як у разі пригнічення розвитку *Bacillus spp.* шляхом вивільнення вторинних метаболітів у поживне середовище. Форма мікроміцета на поверхні контрольної

чашки Петрі округла, структура – ватоподібна, колонія непрозора. Ріст *Fusarium culmorum* показано на рис. 3.4.



Рис. 3.4. Розростання *Fusarium culmorum* на поверхні поживного середовища

3.5. Результати фарбування за Грамом та біохімічних тестів

Фарбування за Грамом – одна з ключових методик у мікробіології, яка передбачає поділ бактерій на грампозитивні та грамнегативні спираючись на відмінності в будові клітинних стінок між групами. Отримані в ході виконання процесу розбіжності забарвлення обумовлені різною товщиною пептидогліканового шару і присутністю зовнішньої мембрани.

Барвник генціанвіолет, що залучений до процесу, володіє здатністю взаємодіяти з бактеріальним пептидогліканом внаслідок проходження через стінку клітини. Розчин Люголя містить йод, який утворює з барвником комплекс, що впливає на розчинність у воді та органічних розчинниках, знижуючи її.

Висновки про приналежність мікроорганізмів до однієї з двох основних груп робили відповідно до зміни кольору. Забарвлення грампозитивних бактерій

повинно лишатись темно-фіолетовим, тоді як грамнегативні набувають рожево-червоного кольору. Товщина пептидогліканового шару грампозитивних бактерій вища за товщину грамнегативних у 4-40 разів, тому відбувається утримування барвника в межах клітинної стінки. Окрім цього, грамнегативні мікроорганізми характеризуються зовнішньою мембраною, що обумовлює вибірккову проникність сполук, в тому числі й барвників [66].

В ході фарбування встановлено, що виділені ізоляти є грампозитивними, що притаманно для *Bacillus spp.*.

Зважаючи на те, що представники *Bacillus spp.* виявляють позитивний результат при проведенні тесту на каталазу, він був обраний в ролі одного з основних при встановленні родової належності. У разі позитивної реакції спостерігається утворення газових пухирців. Якщо ж фермент відсутній, формування бульбашок газу не фіксується. В нашому випадку спостерігалось утворення бульбашок, тому бактеріальний агент може бути частиною роду *Bacillus*.

В бактерій роду *Bacillus* тест на амілазну активність є позитивним. Розчин Люголя додають для утворення характерного синьо-фіолетового кольору при реакції йоду з крохмалем. На позитивний перебіг реакції вказує прозора зона поблизу колонії або ділянка, яка відзначається суттєвим зниженням інтенсивності забарвлення. У разі виявлення негативного результату колір середовища не підлягає змінам, тобто ферментативне розщеплення крохмалю не відбувається. При дослідженні відбувалось формування зони світло-синього кольору, що притаманно для *Bacillus spp.*.

Мікроорганізми *Bacillus spp.* характеризуються здатністю розщеплювати казеїн до амінокислот та розчинних пептидів. Трипсиново-соєвий агар перед інкубацією має жовто-коричневий колір. В разі, якщо поблизу колоній спостерігається знебарвлення, тест є позитивним. Про негативний результат свідчить відсутність прозорої зони, що вказує на нестачу в бактерій

протеолітичних ферментів. При культивуванні виділених ізолятів спостерігалось утворення прозорої зони, що є характерним для *Bacillus spp* [68].

Отже, морфолого-культуральні ознаки, антагоністична активність відносно мікроміцетів, фарбування за Грамом, а також біохімічні тести підтверджують приналежність бактерій до роду *Bacillus*.

ВИСНОВКИ

1. Проведено літературний огляд на основі якого обґрунтовано біопротекторний потенціал бактерій роду *Bacillus*. Досліджено препарати до складу яких входять мікроорганізмів даного роду, механізм пригнічення фітопатогенів.
2. Виділено мікроорганізми з ґрунту, розглянуто їх культуральні ознаки та морфологічні риси. Відібрано 5 ізолятів, що при первинній ідентифікації були подібні до бактерій роду *Bacillus*, тобто за формою колонії переважно були округлими, а їх краї – нерівними. Вони мали гладку поверхню, білий та кремовий колір, непрозорі, опуклі.
3. Використано метод агарових блоків для оцінки здатності п'яти ізолятів пригнічувати мікроміцети. Виявлено, що ізоляти під номером 1, 2 та 3 не були активними. В свою чергу, через 7 діб від початку дослідження встановлено, що коефіцієнт активності ізолята номер 4 складав 2,67 (діаметр зони затримки росту 16 мм), а показник активності ізолята номер 5 становив 3,33 (діаметр зони інгібування 20 мм).
4. Виокремлено 2 найбільш активних ізолята і застосовано метод зустрічних культур з метою оцінки фунгіцидної дії відносно *Fusarium culmorum*. В першій чашці Петрі фіксувалось стримування росту мікроміцета навіть через 30 днів спільного культивування з бактеріальним агентом, тоді як в другій чашці Петрі бактерії обмежували ріст гриба лише на початкових етапах. До того ж, пригнічення розвитку *Fusarium culmorum* супроводжувалось морфологічними змінами його колонії.
5. З метою подальшої ідентифікації виконано фарбування за Грамом, з'ясовано, що бактерії є грампозитивними (колір після фарбування лишився темно-фіолетовим), встановлено, що ізоляти мають здатність розщеплювати казеїн, крохмаль, характеризуються каталазною активністю, що є типовим для представників роду *Bacillus*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Rogers K. Bacillus | Definition, Features, & Types. Encyclopedia Britannica. 1998. с. 1–3.
2. Fouad M. F. Taxonomy of genus Bacillus. *Frontiers in Microbiology*. 2017. с. 5–6.
3. VOTAVA, Miroslav, et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. Vydání. Brno : Neptun, 2003. с. 112–113.
4. Загальна характеристика бактерій роду Bacillus. Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара. Дніпро, 2020. с. 1.
5. Joshi S. Prevalence of Bacterial Contamination when using a Diversion Pouch during Blood Collection. A Single Center Study in Malaysia. 2024. с. 6–7.
6. Kazemi R. Identification and characterization of feather-degrading bacteria from keratin-rich wastes. 2022. с. 3–4.
7. Koushik G. Characterization of Bacilli Isolated from the Gut of Rohu, Labeo rohita, Fingerlings and Its Significance in Digestion. 2022. с. 10–12.
8. Bottone E. J. Bacillus cereus, a Volatile Human Pathogen – PMC. *Clin Microbiol Rev*. 2010. с. 382–398.
9. Kotzekidou P. Bacillus Stearothermophilus. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 1999. с. 124–129.
10. Konuray G., Erginkaya Z. Potential Use of Bacillus coagulans in the Food Industry – PMC. Department of Food Engineering, Cukurova University. 2018. с. 92.
11. Darmbakterien und Bewegung. University of Zurich. 2023. с. 4.
12. Zhu S., Wang Y., Xu X., Liu T., Wu D., Zheng X., et al. Potential use of high-throughput sequencing of soil microbial communities for estimating the adverse effects of continuous cropping on ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud). Institute for Sustainable Plant Protection. 2018. с. 83–85.

13. Li N., Gao D., Zhou X., Chen S., Li C., Wu F. Intercropping with Potato-Onion Enhanced the Soil Microbial Diversity of Tomato. Department of Horticulture, Northeast Agricultural University. 2020. c. 8.
14. Soman C., Li D., Kent A. D. Long-term fertilizer and crop-rotation treatments differentially affect soil bacterial community structure. *Plant and Soil*. 2017. c. 145–159.
15. Zhao Y., Mao X., Zhang M., Yang W., Di H., Ma L., et al. Response of soil microbial communities to continuously mono-cropped cucumber under greenhouse conditions in a calcareous soil of north China. *Journal of Soils and Sediments*. 2020. c. 2446–2459.
16. Murtaza M., Pang Q., Gong Z., Yang T., Tu D., Zhen O., et al. Continuous Cropping Changes the Composition and Diversity of Bacterial Communities: A Meta-Analysis in Nine Different Fields with Different Plant Cultivation. Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences. 2021. c. 12.
17. Lienhard P., Terrat S., Prévost-Bouré N., Nowak V., Régnier T., Sayphoummie S., et al. Pyrosequencing evidences the impact of cropping on soil bacterial and fungal diversity in Laos tropical grassland. *Agronomy for Sustainable Development*. 2024. c. 525–533.
18. Li J., Gan G., Chen X., Zou J. Effects of Long-Term Straw Management and Potassium Fertilization on Crop Yield, Soil Properties, and Microbial Community in a Rice–Oilseed Rape Rotation. Agricultural Science and Technology Service Center. 2021. c. 12.
19. Zeng J., Liu X., Song L., Lin X., Zhang H., Chu H. Nitrogen fertilization directly affects soil bacterial diversity and indirectly affects bacterial community composition. *Soil Biology and Biochemistry*. 2016. c. 41–49.
20. Dang P., Li C., Lu C., Zhang M., Huang T., Wan C., et al. Effect of fertilizer management on the soil bacterial community in agroecosystems across the globe. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2022. c. 112–114.

21. Hartman K., Heijden M., Wittwer R., Banerjee S., Walser J., Schlaepp K. Cropping practices manipulate abundance patterns of root and soil microbiome members paving the way to smart farming. *Microbiome*. 2018. c. 337–339.
22. Zou J., Jiang H., Cheng H., Fang J., Huang J. Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022. c. 781–789.
23. Abriouel H., Franz C., Omar N., Gálvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology*. 2021. c. 201–232.
24. Fira D., Dimkić I., Berić T., Lozo J., Stanković S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*. 2023. c. 44–55.
25. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*. 2005. c. 845–857.
26. Gélis-Jeanvoine S., Canette A., Gohar M., Caradec T., Lemy K., Gominet M., et al. Genetic and functional analyses of *krs*, a locus encoding kurstakin, a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis*. *Research in Microbiology*. 2017. c. 356–368.
27. Adimpong D., Sørensen K., Thorsen L., Stuer-Lauridsen B., Abdelgadir W., Nielsen D., et al. Antimicrobial Susceptibility of *Bacillus* Strains Isolated from Primary Starters for African Traditional Bread Production and Characterization of the Bacitracin Operon and Bacitracin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2022. c. 5–8.
28. Wan Y., Stanovych A., Gori D., Zirah S., Kouklovsky K., Alezra V. β, γ -diamino acids as building blocks for new analogues of Gramicidin S: Synthesis and biological activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021. c. 122–128.
29. Wang T., Liang Y., Wu M., Chen J., Lin J., Yang L. Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2015. c. 744–754.
30. Ongena M., Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*. 2020. c. 115–125.

31. Zalila-Kolsi I., Mahmoud A., Ali H., Sellami S., Nasfi F., Tounsi S. Antagonist effects of *Bacillus* spp. Strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat (*Triticum turgidum* L. Subsp. Durum). *Microbiological Research*. 2016. c. 148–158.
32. Ongena M., Jacques P., Touré Y., Destain J., Jabrane A., Thonart P. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2023. c. 29–38.
33. Fiore M., Silva-Stenico M. Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4a. *Agricultural Microbiology*. 2019. c. 66.
34. Kumar M., Brar A., Yadav M., Chawade A., Vivekanand V., Pareek N. Chitinases—Potential Candidates for Enhanced Plant Resistance towards Fungal Pathogens. *Agriculture*. 2018. c. 88.
35. Saber W., Ghoneem K., Al-Askar A., Rashad Y., Ali A., Rashad E. Chitinase production by *Bacillus subtilis* ATCC 11774 and its effect on biocontrol of *Rhizoctonia* diseases of potato. *Acta Biologica Hungarica*. 2022. c. 436–448.
36. Seo D., Lee J., Song W., Park D., Jung V. Expression patterns of chitinase and chitosanase produced from *Bacillus cereus* in suppression of phytopathogen. *Microbial Pathogenesis*. 2014. c. 31–36.
37. Planas A. Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000. c. 361–382.
38. Gautam S., Chauhan A., Sharma R., Sehgal R., Shirkot C. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial canker of tomato incited by *Clavibacter michiganensis* ssp. *Michiganensis*. *Microbial Pathogenesis*. 2019. c. 196–203.
39. Guleria S., Walia A., Chauhan A., Shirkot C. Molecular characterization of alkaline protease of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 involved in biocontrol of *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Food Microbiology*. 2016. c. 134–143.

40. Saha M., Sarkar S., Sarkar B., Sharma B., Bhattacharjee S., Tribedi P. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*. 2022. c. 3984–3999.
41. Hertlein G., Müller S., Garcia-Gonzalez E., Poppinga L., Süßmuth R., Genersch E. Production of the Catechol Type Siderophore Bacillibactin by the Honey Bee Pathogen *Paenibacillus larvae*. *Plos One*. 2022. c. 1.
42. Yu X., Ai C., Li X., Zhou G. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*. 2021. c. 138–145.
43. Villa-Rodríguez E., Parra-Cota F., Castro-Longoria E., López-Cervantes J., Santos-Villalobos S. *Bacillus subtilis* TE3: A promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum). *Biological Control*. 2019. c. 135–143.
44. Bhattacharyya P., Goswami M., Bhattacharyya L. Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: a review. *Mycology & Microbiology Department*. 2021. c. 1.
45. Xie G., Su B., Cui Z. Isolation and identification of N₂-fixing strains of *Bacillus* in rice rhizosphere of the Yangtze River valley. *Acta Microbiologica Sinica*. 1998 c. 480–483.
46. Richardson A., Simpson R. Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. *Plant Physiology*. 2011. c. 989–996.
47. Saeid A., Prochownik E., Dobrowolska-Iwanek J. Phosphorus Solubilization by *Bacillus* Species. *Molecules*. 2018. c. 2897.
48. Chowdappa P., Kumar S., Lakshmi M., Upreti K. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. *Biological Control*. 2023. c. 109–117.

49. Ramos-Solano B. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*. 2008. с. 206–211.
50. Ortíz-Castro R., Valencia-Cantero E., López-Bucio J. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signaling & Behavior*. 2018. с. 263–265.
51. Gamalero E., Glick B. Bacterial Modulation of Plant Ethylene Levels. *Plant Physiology*. 2015. с. 13–22.
52. Park Y., Mun B., Kang S., Hussain A., Shahzad R., Seo C. *Bacillus aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *Plos One*. 2023. с. 156–159.
53. Хаблак С. Фунгіциди на основі бактерій — природна протидія фітопатогенам. *Агроном*. Київ. 2024. с. 1–5.
54. Фітодоктор. ENZIM Agro. 2024. с. 1. URL: <https://agro.enzim.biz/fitodoktor.html>
55. Фітоцид-Р. ТМ «Жива Земля». 2022. с. 1. URL: <https://zhyvazemlia.com/ua/td0034496-f-tocid-fitocid-ks-sc-b-opreparat-fung-cidno-d-fasuvannya-0-51-ua>
56. Фунгіцид Флорабацилін. НВЦ «Черкасибіозахист». 2023. с. 1. URL: <https://pesticidi-mikrobnii-preparati/lorabacilin-id29660>
57. Серенада АСО. Bayer Group. 2025. с. 1. URL: <https://www.cropscience.bayer.ua/Products/Fungicides/Serenada>
58. Регулятор росту Інтеграл Про. Badische Anilin & Soda-Fabrik. 2024. с. 1. URL: <https://pesticidi-regulyatori-rostu/2353-integral-pro-id8060>
59. Sanjaya A., Praseptianga D., Zaman M., Umiati V. Effect of pH, temperature, and salt concentration on the growth of *Bacillus subtilis* T9-05 isolated from fish sauce. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*. 2023. с. 5–8.

60. Rowińska P., Gutarowska B., Janas R., Szulc J. Biopreparations for the decomposition of crop residues. *Microb Biotechnol.* 2024. с. 17.
61. Загальний мікробіологічний аналіз ґрунту. Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет. Дніпро. 2018. с. 32.
62. Агар Чапека-Докса. Біолайф. 2024. С. 1. URL: <https://simesta.com/products/agar-chapeka-doksa-czapek-dox-agar-401360>
63. Цехмістер Г.В., Кислинська А.С., Павленко А.А. Антагоністична активність ґрунтових мікроорганізмів як ефективний засіб захисту рослин від акремоніозу. *Сільськогосподарська мікробіологія.* 2019. с. 46–53.
64. Визначення антибіотичної активності мікроорганізмів. Національний університет харчових технологій. Київ. 2019. с. 7.
65. Сусло агар. ТОВ «Хімлаборреактив». 2025. с. 1. URL: <https://shop.hlr.ua/ua/agar-suslo-wort-agar-merck-84006.html>
66. Демченко І.Б., Семенів І.П. Забарвлення за Грамом. Державна Служба України з лікарських засобів. 2012. с. 1–4.
67. Aijaz S. Gram Staining. *Medizzy.* 2022. с. 1. URL: <https://medizzy.com/feed/35241023>
68. Методичні рекомендації для відпрацювання практичних навичок з технологічної, виробничої, переддипломної та науково-дослідної практик. Відкритий міжнародний університет розвитку людини “Україна”. Київ. 2020. с. 108–125.
69. Трипсиново-соєвий агар. ТОВ «Хімлаборреактив». 2025. с. 1. URL: <https://shop.hlr.ua/ua/agar-tripsinovo-soevyy-merck-47257.html>

ДОДАТКИ

Додаток А

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ****ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ
І ЕКОЛОГІЇ****ЗБІРНИК**

матеріалів доповідей

**XI МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ
КОНФЕРЕНЦІЇ СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ****І МОЛОДИХ ВЧЕНИХ****«ЕКОЛОГІЯ – ФІЛОСОФІЯ ІСНУВАННЯ
ЛЮДСТВА»****23-24 квітня 2025 р.**

Київ – 2025

<i>Кобилецький Я.О., Міняйло А.А., Дмитренко Л.А.</i> ЗАБРУДНЕННЯ ҐРУНТОВОГО ПОКРИВУ ЗА ВОЄННОГО ВПЛИВУ ПРИ РУЙНУВАННІ НАФТОПЕРЕРОБНИХ ЗАВОДІВ (НА ПРИКЛАДІ М. КРЕМЕНЧУК)	65
<i>Коваль М.В., Бережняк С.М.</i> РОЗВИТОК АЛЬТЕРНАТИВНИХ ДЖЕРЕЛ ЕНЕРГІЇ В УМАНІ ТА МІСЦЕВИХ ГРОМАДАХ	67
<i>Корнілевська С.І., Кваско О.Ю.</i> ФУНГЦИДНІ ВЛАСТИВОСТІ БАКТЕРІЙ <i>BACILLUS SPP.</i>	68
<i>Корсунський О.В., Субін О.В.</i> ВВЕДЕННЯ <i>MURTUS COMMUNIS</i> В АСЕПТИЧНУ КУЛЬТУРУ	70
<i>Косман А.С., Дащенко А.В.</i> АКТИВНІСТЬ КАТАЛАЗИ ТА ВМІСТ ФОТОСИНТЕТИЧНИХ ПІГМЕНТІВ У ПІВОНІЯХ	71
<i>Кравець Г.С., Клепко А.В.</i> РАДІАЦІЙНА БЕЗПЕКА УРАНОВИДОБУВНОЇ ТА УРАНОПЕРЕРОБНОЇ ПРОМІСЛОВОСТІ УКРАЇНИ	73
<i>Кравченко І., Ладика М.М.</i> КЛІМАТИЧНІ РЕАЛІЇ СЬОГОДЕННЯ ТА ЇХ ВПЛИВ НА УКРАЇНУ І СВІТ	75
<i>Крохан Я.Р., Ракоїд О.О.</i> ВПЛИВ БОЙОВИХ ДІЙ НА ҐРУНТИ: ЕКОЛОГІЧНІ НАСЛІДКИ ТА ЗАГРОЗИ ДЛЯ ДОВКІЛЛЯ	78
<i>Кудашкін Г.В., Герасимов О.І.</i> МОДЕЛЮВАННЯ КОМПОЗИТНИХ СТРУКТУР ЯК БАГАТОЧАСТИНКОВИХ ДИСКРЕТНИХ ПОЛІДИСПЕРСНИХ КОНГЛОМЕРАЦІЙ	80
<i>Ладика М.М., Билим О.О.</i> АНТРОПОГЕННЕ НАВАНТАЖЕННЯ НА БАСЕЙН РІЧКИ ОСТЕР	82
<i>Латик В.</i> ВИКОРИСТАННЯ СВЕЙЛІВ У СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ	84
<i>Лелюшок С.В., Наумовська О.І., Молдаван Л.П.</i> БІОТЕСТУВАННЯ ҐРУНТУ АГРОЕКОСИСТЕМ ЗА ВПЛИВУ НЕСАНКЦІОНОВАНИХ СМІТТЄЗВАЛИЩ	85
<i>Литвиненко С.А., Дащенко А.В.</i> МОНІТОРИНГ ГРИБКОВИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ЛИСТЯ ТА ПЛОДІВ <i>QUERCUS ROBUR</i> МЕТОДОМ ПІР В МЕЖАХ МІСТА КІЄВА	87
<i>Литвинчук А.Д., Ілєнко В.В.</i> НОРМАТИВНО-ПРАВОВЕ РЕГУЛЮВАННЯ ВМІСТУ ПРИРОДНИХ РАДІОНУКЛІДІВ У БУДІВЕЛЬНИХ МАТЕРІАЛАХ	90
<i>Любчиков Р.С.</i> ВИКОРИСТАННЯ БІОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ БІОІНДИКАЦІЙНОЇ ОЦІНКИ ВОДНИХ ЕКОСИСТЕМ	92

УДК 604.2:632.952/953

ФУНГІЦИДНІ ВЛАСТИВОСТІ БАКТЕРІЙ *BACILLUS SPP.*

Корнілевська С.І., студентка 4 курсу, факультету захисту рослин, біотехнологій та екології

Кваско О.Ю., кандидат біологічних наук, завідувач кафедру екобіотехнології та

біорізноманіття

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Через зростаючу екологічну напругу та обмеження на використання хімічних засобів захисту рослин, особливої уваги заслуговує пошук альтернативних методів фітосанітарного захисту агроценозів. Бактерії роду *Bacillus spp.*, завдяки своїй високоспецифічній біологічній активності, здатні продукувати широкий спектр вторинних метаболітів, в тому числі антибіотиків та ферментів, що зумовлює їх потужний антагоністичний потенціал проти фітопатогенних грибів. Вивчення фунгіцидних властивостей *Bacillus spp.* є надзвичайно важливим в контексті біологізації землеробства та підтримання агроекологічної рівноваги.

За допомогою методу серійних розведень, що супроводжувався культивуванням мікроміцетів на м'ясо-пептонному агарі (МПА), вдалося виростити ізоляти *Bacillus spp.*

Колонії мали характерну морфологію: кремово-біле забарвлення, гладеньку поверхню, нерідко – хвилясті або фестончасті краї, що є типовим для багатьох представників роду.

У процесі дослідження було успішно реалізовано комплекс мікробіологічних методик, спрямованих на виявлення антагоністичної активності ґрунтових бактерій роду *Bacillus* щодо фітопатогенних грибів. Проведення експериментів із застосуванням методу зустрічних культур і методу агарових блоків дозволило виявити ізоляти *Bacillus*, які здатні продукувати антимікробні сполуки, що інгібують розвиток міцелію мікроміцетів.

Метод зустрічних культур забезпечив візуалізацію прямого антагонізму між бактеріальним агентом та фітопатогеном, дозволив зафіксувати утворення чітких зон інгібування росту грибів, що свідчить про активне виділення бактеріальними клітинами антибіотичних вторинних метаболітів. Морфологічні зміни структури грибного міцелію у порівнянні з контрольною чашкою вказували на деструктивну дію бактеріального агента. Цей метод також продемонстрував потенціал штамів до конкурентного витіснення патогенів з інокульованого середовища [1].

Застосування методу агарових блоків підтвердило та кількісно охарактеризувало антагоністичну активність ізольованих штамів *Bacillus spp.* За допомогою обчислення індексу інгібування встановлено, що бактерії здатні формувати зони затримки росту грибів значного діаметру, що свідчить про високу інтенсивність синтезу антагоністичних речовин. Сусло-агарове середовище виявилось ефективним для росту мікроміцетів та наочної фіксації протифунгіцидної дії бактеріального агента. Додаткове внесення контролю без бактеріального ізоляту дозволило чітко порівняти темпи росту та морфологічні ознаки мікроміцету, що поглибило достовірність результатів [2].

Ідентифікація бактеріальних ізолятів здійснювалась за допомогою мікроскопічного аналізу, фарбування за Грамом та серії біохімічних тестів. Відповідно до результатів фарбування, всі виділені представники відзначалися темно-фіолетовим кольором, що підтверджує їхню грампозитивну природу. Біохімічне тестування засвідчило позитивну каталазну активність, встановлено позитивну амілазну активність та здатність бактерій розщеплювати крохмаль – важлива властивість у контексті їхньої трофічної гнучкості. Додатково підтверджено протеолітичну активність ізолятів, зокрема здатність до розщеплення казеїну, що є непрямым свідченням синтезу ферментів, задіяних у руйнуванні білкових структур фітопатогенних грибів.