

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І**  
**ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**ГОНЧАР АНАСТАСІЯ МИКОЛАЇВНА**

УДК 579.64:631.46

ДИСЕРТАЦІЯ

***BACILLUS SUBTILIS*: ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНИХ  
ВЛАСТИВОСТЕЙ ТА ОСОБЛИВОСТІ МІКРОБНО-РОСЛИННОЇ  
ВЗАЄМОДІЇ В РИЗОСФЕРІ ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ**

201 «Агрономія»  
20 «Аграрні науки та продовольство»

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень.  
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання  
на відповідне джерело А. М. Гончар

Науковий керівник  
**ТОНХА Оксана Леонідівна**,  
доктор сільськогосподарських наук,  
професор

Київ – 2023

## АНОТАЦІЯ

**Гончар А.М. *Bacillus subtilis*: характеристика біологічних властивостей та особливості мікробно-рослинної взаємодії в ризосфері пшениці озимої.** Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 201 «Агрономія» (20 «Аграрні науки та продовольство»). Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2023.

У дисертаційній роботі представлено результати дослідження біологічних властивостей штамів *Bacillus subtilis* та особливостей їх розвитку та взаємодії в ризосфері рослин пшениці озимої.

На основі аналізу та літературних джерел показано актуальність досліджень з вивчення спорових бактерій *Bacillus subtilis* – потенційних мікробних агентів поліфункціональної дії для забезпечення трофічної структури метаболізму біологічних систем в ризосфері рослин, біопротекторної дії, індукції системної стійкості рослин від фітопатогенних організмів. Акцентується увага на значенні фундаментально-прикладних досліджень щодо варіабельності властивостей бактерій роду *Bacillus* (адгезивних, рістстимулюючих, антагоністичних), виділених з різних агроценозів, поглиблення знань в аспекті генетичних профілей *B. subtilis* в різних еконішах, аналізу їх морфолого-культуральних, фізіолого-біохімічних властивостей як перспективних продуцентів. Особливої уваги заслуговує вивчення поліфункціональної активності бактерій *B. subtilis*, асоційованих з ризосферою культурних злакових рослин через призму рослинно-мікробних взаємодій (за типом індукційних трансформацій на морфологічному, цитологічному, фізіолого-біохімічному, генетичному рівнях в організмі).

Робота виконувалась у період 2019-2023 років на базі кафедри ґрунтознавства та охорони ґрунтів імені професора М.К. Шикули агробіологічного факультету Національного університету біоресурсів і природокористування України, м. Київ.

У ході досліджень визначено чисельність ґрунтових мікроорганізмів (бактерії, мікроміцети, спорові бактерії) під пшеницею озимою у період весняної та літньої вегетації на чорноземі типовому та показано варіабельність мікробної біомаси за сортовими варіантами вирощування даної культури (відокремлений підрозділ НУБіП України «Агрономічна дослідна станція», с. Пшеничне, Васильківський р-н, Київська обл.). Встановлено, що сортова специфічність значно пов'язана з особливостями формування мікробіому у різні фази росту і розвитку рослин, що є інтегральним показником функціональної та метаболічної активності ґрунтових мікроорганізмів. Чисельність та склад мікробного комплексу ризосфери пшениці озимої у процесі онтогенезу значно змінюється, особливо за співвідношенням чисельності спороутворюючих та неспорових форм мікроорганізмів при однакових умовах агротехніки вирощування культури. Загальний пул сапротрофних мікроорганізмів ризосфери демонструє варіабельність біомаси та зміни на користь екологопластичних бацил. Встановлено збільшення чисельності спороутворюючих бактерій до  $4,2 \times 10^7$  КУО/г у варіантах вирощування окремих сортів. Показано, що при вирощуванні різних сортів пшениці озимої спостерігається стабільні показники інтенсивності виділення  $\text{CO}_2$  – від 5,2 до 7,0 мкг/г. Аналогічна динаміка простежується за показником поглинання  $\text{O}_2$  (не більше 5,3-6,8 мкг/г).

З 20 сортів пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) вітчизняної селекції (філоплана та ризосфера кореневої системи; чорнозем типовий, профіль до 40 см; фази трубкування та колосіння-наливу зерна) класичними мікробіологічними методами виділено 29 ізолятів бактерій, які охарактеризовано за морфологічними ознаками як представники грампозитивних, спороутворюючих бактерій роду *Bacillus* sp. У фазу колосіння-наливу зерна скринінговими дослідженнями виявлено непігментовані форми колоній бактеріальних ізолятів, 19 з яких віднесено до колоніально-морфологічного різноманіття R-типу (шорсткий край колоній, діаметр яких від 7 мм до 13 мм).

При аналізі фізіологічного стану клітин популяцій ґрунтових ізолятів встановлено технологічну специфічність за параметрами інтенсивності формування спор за рівних умов і термінів інкубації (до 48-72 годин). Зафіксовано формування до 90,0% вільних спор в аксенічних культурах вже через 72 години культивування та не більше 10,0% проспор у дослідних моноізолятів зі стабільними морфологічними ознаками. Встановлено, що ізоляти Н10 і Н45 проявили здатність до росту при підвищених температурах культивування (+37...+40°C), а по відношенню до рН середовища досліджені ізоляти здатні рости при широких діапазонах рН 4,5-8,0.

При диференційному діагностичному тестуванні виявлено, що як єдине джерело вуглецю дослідні ґрунтові ізоляти використовують з утворенням кислоти арабінозу, ксилозу, маніт, глюкозу, галактозу, фруктозу, мальтозу, сорбіт, гліцерин, декстрин, крохмаль, рамнозу і дульцит (з утворенням луку). Спостерігається активне використання мінеральних форм азоту: солі амонію і нітрати, амінокислоти і білки. Ізоляти гідролізують казеїн, желатину, крохмаль, а при рості у молоці з лакмусом відбувається відновлення лакмусу. Мають каталазну активність та виявились оксидазопозитивними. При біохімічному тестуванні за допомогою тест-системи АРІ встановлено, що досліджувані ізоляти бактерій відрізняються за спектром зброджуваних вуглеводів, редукцією нітратів. Ізоляти Н38 і Н40 за умов глибинної ферментації проявили здатність росту при підвищених температурних діапазонах культивування (40°C) протягом 48 годин (за фактом початку спороутворення). В результаті проведених досліджень показано, що за ключовими морфологічними і біохімічними ознаками штами Н3, Н10, Н13, Н36, Н38, Н40, Н43, Н45 споріднені з референтним штамом *B. subtilis* 8a та віднесено до роду *Bacillus* sp., виду *B. subtilis*.

Порівнюючи результати, які отримано в дослідженні з результатами, описаними у наукових публікаціях вчених відмічено, що морфологічна та фізіолого-біохімічна характеристика нових ізолятів бактерій, відібраних з агроценозу пшениці озимої, поглиблює наші знання з фундаментальної точки

зору. Завдяки своїм біологічним властивостям штами природного типу Н3, Н10, Н13, Н36, Н38, Н40, Н43, Н45 можуть бути перспективними для розробки ефективних технологій виробництва мікробних препаратів, а також всебічного вивчення механізмів рослинно-мікробних взаємодій (за типом індукційних трансформацій на морфологічному, фізіолого-біохімічному, генетичному рівнях в організмі). Отримані експериментальні дані щодо біологічних характеристик нових штамів *Bacillus subtilis* – продуцентів метаболітів, адаптованих до умов ризосфери пшениці озимої, підтверджують актуальність дисертаційної роботи.

Модельними дослідженнями визначено особливості впливу нових штамів *B. subtilis* (Н3, Н10, Н13, Н36, Н38, Н40, Н43, Н45) на розвиток проростків пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) у разі застосування інокуляційних бактеріальних культур (культуральні рідини штамів *B. subtilis* за різних технологічних форм і розведень). Встановлено, що при розведеннях 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 спостерігається стимулювальна дія біоагентів, а максимальний ефект досягається при розведенні 1:100. Показано, що найбільший позитивний вплив на проростання насіння пшениці мали інокулянти *B. subtilis*, які наносили на насіння у зрілих технологічних формах (спорова культура,  $2,0 \times 10^7$  клітин на насінину). Енергія проростання насіння *Triticum aestivum* L. підвищується при взаємодії з інокулянтами *B. subtilis* до 96,5%, а також збільшується сира маса проростків на 84,0-109,6% залежно від варіанту дослідження порівняно з контролем, що свідчить про рістстимулювальні властивості нових штамів. Доведено, що за використання зрілих спорових культур *B. subtilis* Н38, Н40 і Н45 відбувається зростання маси коренів на 4,8-11,3% порівняно з контролем без бактеризації. При обробці культуральними рідинами штамів *B. subtilis* Н3, Н10, Н13, Н36, Н43 у формі вегетативних клітин маса коренів зменшується на 11,8-44,0% порівняно з контролем.

Підтверджено, що передпосівна обробка насіння на сьогодні залишається найбільш доступним і ефективним агрозаходом. Оскільки рослинно-мікробна взаємодія (колонізація ризосфери, філоплани рослин; продукування

антимікробних метаболітів, фізіологічно-активних, фітогормональних речовин ауксинової, гіберелінової, цитокінінової природи та вітамінів; індукція системної стійкості у рослині тощо) розглядається як важливий механізм біологічного контролю аграрних систем.

Вперше підтверджена технологічність штамів *B. subtilis* H38, H40 і H45 та перспективність їх використання в якості ефективних інокулянтів, зокрема для оцінки фітостимуляційних, регуляторних властивостей мікробного агента та перебігу фотохімічної активності рослин пшениці озимої в процесі онтогенезу. Встановлено стабільність технологічних характеристик штамів *B. subtilis* H38, H40, H45 як при глибинному культивуванні в рідкому середовищі LB до 72 годин (титр спор від 1,89 до 2,43 млрд. спор/мл КР), так і при подальшому зберіганні культуральної рідини (КР) упродовж 60 діб в температурному діапазоні 18-20°C (титр спор становив 1,81-2,33 млрд. спор/мл відповідно).

Дана оцінка впливу бактеріальних інокулянтів *B. subtilis* на фотосинтетичний апарат тест-рослин пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) та виявлено високу інформативність індукційних змін флуоресценції хлорофілу (ІФХ) у структурній організації хлоропластів проростків пшениці за комплексом параметрів (від початкових, максимальних до стаціонарних рівней флуоресценції, а також індексу життєздатності). Доведено перспективність використання бактеріальних інокулянтів *B. subtilis* в аспекті фотохімічної активності рослин пшениці озимої в процесі онтогенезу, що має науково-практичне значення для екологічного моніторингу, оцінки стійкості рослин та впровадження біологічних засобів у технологіях вирощування сільськогосподарських культур.

Розширено уявлення про антагоністичні властивості бактерій *B. subtilis*, які мають перспективу для біотехнології отримання ефективної антифунгальної продукції. Так, за спектром антагоністичної активності нові штами *B. subtilis* H38, H40 характеризувались високою активністю щодо фітопатогенних бактерій *Pectobacterium carotovorum* 8982, *Xanthomonas campestris* 80036, а також *Pseudomonas syringae* ssp., зокрема *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 і *P.*

*syringae* pv. *syringae* 8511. Штами *B. subtilis* H10, *B. subtilis* H36 продемонстрували середню антагоністичну активність щодо вищезазначених тестових фітопатогенів. Показано, що надосадова фракція культуральної рідини штамів *B. subtilis* має середню антагоністичну активність щодо екологічно пластичного тест-мікроміцету *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2, який здатний до синтезу тріхотеценових токсинів. Так, зона пригнічення росту вищезазначеного мікроміцету складала від 16 до 18 мм у варіантах з 72-годинним періодичним культивуванням бактерій. Штам *B. subtilis* H40 відрізнявся від інших дослідних культур та проявив високу активність (зона пригнічення росту тестового мікроміцету в межах 24-25 мм). Вже на десяту добу експерименту (у варіантах при 120 годинах культивування штамів *B. subtilis*) антагоністична активність надосадової рідини *B. subtilis* H10, *B. subtilis* H36, *B. subtilis* H38, *B. subtilis* H40 та *B. subtilis* IMB B-7516 поступово зменшувалась, але не входила в групу слабкої активності (рівень не менше 12 мм). Для фітопатогенного організму *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45 спостерігалась схожа тенденція прояву середнього рівня антагоністичної активності метаболітів штамів *B. subtilis*, але показники інгібування тест-культури мікроміцету надосадовою рідиною штамів *B. subtilis* H10, *B. subtilis* H36 і *B. subtilis* H38 значно зменшились (<10 мм) у варіантах 120-годинного накопичення метаболітів. Антагоністична активність штамів *B. subtilis* з індикаторними тестовими фітопатогенами *Gaeumannomyces* та *Pythium* була більш виражена у варіантах з *B. subtilis* H40 та *B. subtilis* H36. Зміни характеру активності (у бік її зниження) спостерігались у варіантах зі штамми *B. subtilis* H38 і *B. subtilis* H10. Отже, вперше встановлено, що штамми *B. subtilis* H38, H40 активно впливають на фітопатогенні мікроміцети та бактерії. Це розкриває можливості використання нових біоагентів *B. subtilis* H38, H40 як базис для створення мікробного препарату нового покоління з функцією фітоконтролю хвороб різної етіології.

Вперше виявлено здатність штаму *B. subtilis* H38 після досягання технологічної зрілості щодо формування повноцінної біоплівки на кореневій системі пшениці озимої, яка функціонально спроможна контролювати і захищати сільськогосподарські рослини від фітопатогенних форм мікроорганізмів. Показано, що штам *B. subtilis* H38, який внесено в ґрунт з насінням озимої пшениці, ефективно приживався в ризосфері культури, при цьому ступінь приживаності штаму *B. subtilis* H38 залежала від вибраного експериментального антибіотика, зокрема стрептоміцину, канаміцину. Встановлено, що на 50 добу модельного досліду чисельність ST-резистентного мутанту штаму *B. subtilis* H38 становила 2,6 млн. КУО/г сухого ґрунту, що на 30,0% перевищує контроль. Щодо динаміки чисельності стійких до канаміцину бактерій штаму *B. subtilis* H38 спостерігалось збільшення приживаності бактерій, їх кількість становила 3,5 млн. КУО/г сухого ґрунту ризосфери пшениці озимої (за 2,5 млн. КУО у контролі, в якому досліджували природно стійкі бактерії *B. subtilis*). Доведено, що біоплівки можна розглядати як додатковий профіль активної конкуренції ризосферного мікробіому в середовищі.

Для виявлення антимікробної активності в ризосферному ґрунті (або безпосередньо в ґрунті) при штучному збагаченні відповідного субстрату-середовища культурами мікроорганізмів з антагоністичними властивостями важливо досліджувати їх здатність приживатися в ґрунті, при цьому виявляти та аналізувати прояв активної конкуренції з різними представниками ґрунтового біому у ризосфері рослин. За використання отриманих антибіотикорезистентних мутантів штаму *B. subtilis* H38 (стійких до стрептоміцину, канаміцину), у модельному вегетаційному досліді було вивчено здатність *B. subtilis* H38 приживатися в ґрунті ризосфери пшениці озимої. Максимальна концентрація антибіотиків для *B. subtilis* H38 становила 1100 мкг./мл (ST), 120 мкг./мл (КА). Проведені дослідження показали, що чисельність ST-резистентного мутанту штаму *B. subtilis* H38 вже на 12 добу досліду становила 4,8 млн. КУО/г сухого ґрунту, а у контролі 3,9 млн. КУО.



При порівнянні отриманих початкових і прикінцевих даних модельного дослідження показано, що вже на 50 добу досліду чисельність ST-резистентного мутанту штаму *B. subtilis* H38 знижувалась у 1,8 разів. За чисельністю ST-резистентного мутанту штаму *B. subtilis* H38 спостерігалось до 2,6 млн. КУО/г сухого ґрунту, що на 30,0% перевищувало контроль. Більш виразна антибактеріальна дія виявлена для експериментального канаміцина, який значно впливає на популяцію мікроорганізмів в ризосферному ґрунті. Впродовж 36 діб динаміка чисельності КА-резистентного мутанту штаму *B. subtilis* H38 знижувалась до 4,7 млн. КУО/г сухого ґрунту (зниження в середньому спостерігалось на 1,4% порівняно із контрольним варіантом). На 50 добу дослідження чисельність стійких до канаміцину бактерій штаму *B. subtilis* H38 становила 3,5 млн. КУО/г сухого ґрунту ризосфери пшениці озимої (за 2,5 млн. КУО у контролі – природно стійкі бактерії). Показано, що штам *B. subtilis* H38, який внесено в ґрунт з насінням озимої пшениці, ефективно приживався в ризосфері культури, при цьому ступінь приживаності штаму *B. subtilis* H38 залежить від вибраного антибіотика, зокрема стрептоміцину, канаміцину.

Доведено високу економічну ефективність застосування заходів інокуляції новим штамом *B. subtilis* H40 при вирощуванні пшениці озимої. Передпосівна інокуляція значно економить ресурси (при додаткових витратах в розрахунку на 1 га лише 1,0%). Крім цього, застосування штаму *Bacillus subtilis* H40 як інокулянту є економічно доцільним, обґрунтованим та сприяє раціональному використанню енергоресурсів у сільськогосподарському виробництві (зниження собівартості продукції та підвищення її рентабельності на 21,7%).

**Ключові слова:** ґрунтові ризосферні бактерії *Bacillus subtilis*, фізіологічно-активні речовини, пшениця озима, інокулянт, рістстимуляція, антагонізм, рослинно-мікробна взаємодія.

## ANNOTATION

**Honchar A.M. *Bacillus subtilis*: characteristics of biological properties and peculiarities of microbial-plant interaction in the rhizosphere of winter wheat.**

The qualification scientific work on the rights of manuscript.

The thesis for the degree of a Doctor of Philosophy of the specialty 201 «Agronomy » (20 «Agricultural sciences and food»). National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2023.

The thesis presents the results of the study of biological properties of *Bacillus subtilis* strains and peculiarities of their development and interaction in the rhizosphere of winter wheat plants.

Based on the analysis and literature sources, the relevance of research on the study of spore bacteria *Bacillus subtilis* - potential microbial agents of multifunctional action to ensure the trophic structure of the metabolism of biological systems in the plant rhizosphere, bioprotective action, induction of systemic resistance of plants against phytopathogenic organisms - is shown. Attention is focused on the importance of fundamental and applied research on the variability of the properties of bacteria of the genus *Bacillus* (adhesive, growth-stimulating, antagonistic) isolated from different agrocenoses, deepening knowledge in terms of genetic profiles of *B. subtilis* in different econo-ecosystems, analysis of their morphological, cultural, physiological and biochemical properties as promising producers. Particular attention should be paid to the study of the multifunctional activity of *B. subtilis* bacteria associated with the rhizosphere of cultivated cereal plants through the prism of plant-microbial interactions (by the type of induction transformations at the morphological, cytological, physiological, biochemical, and genetic levels in the organism).

The work was carried out in 2019-2023 at the M.K. Shykula Department of Soil Science and Soil Protection, Faculty of Agricultural Sciences, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv.

In the course of the research, the number of soil microorganisms (bacteria, micromycetes, spore bacteria) under winter wheat during the spring and summer growing season on typical black soil was determined and the variability of microbial biomass by varietal variants of this crop cultivation was shown (separate subdivision of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine "Agronomic Research Station", Pshenychne village, Vasylkiv district, Kyiv region). It has been established that variety specificity is significantly related to the peculiarities of microbiome formation in different phases of plant growth and development, which is an integral indicator of the functional and metabolic activity of soil microorganisms. The number and composition of the microbial complex of the winter wheat rhizosphere during ontogenesis varies significantly, especially in terms of the ratio of the number of spore-forming and non-spore-forming forms of microorganisms under the same conditions of crop cultivation. The total pool of saprotrophic microorganisms of the rhizosphere demonstrates biomass variability and changes in favour of ecologically plastic bacilli. An increase in the number of spore-forming bacteria up to  $4,2 \times 10^7$  CFU/g in the variants of cultivation of individual varieties was found. It is shown that when growing different varieties of winter wheat, stable indicators of CO<sub>2</sub> emission intensity are observed - from 5,2 to 7,0. A similar dynamics is observed in terms of O<sub>2</sub> absorption (no more than 5.3-6.8).

From 20 varieties of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) of domestic selection (phylloplane and rhizosphere of the root system; typical chernozem, profile up to 40 cm; phases of tubing and earing-heading of grain) 29 bacterial isolates were isolated by classical microbiological methods and characterised by morphological features as representatives of Gram-positive, spore-forming bacteria of the genus *Bacillus* sp. During the earing-loading phase, screening studies revealed non-pigmented forms of bacterial isolates, 19 of which were classified as R-type colonial and morphological diversity (rough edge of colonies, diameter of which ranged from 7 mm to 13 mm).

When analysing the physiological state of cells of soil isolate populations, technological specificity was established in terms of the intensity of spore formation under equal conditions and incubation time (up to 48-72 hours). The formation of up

to 90,0% of free spores in axenic cultures after 72 hours of cultivation and no more than 10,0% of prospora in experimental mono-isolates with stable morphological characteristics was recorded. It was established that isolates H10 and H45 showed the ability to grow at elevated cultivation temperatures (+37...+40°C), and in relation to the pH of the medium, the studied isolates are able to grow at a wide pH range of 4,5-8,0.

Differential diagnostic testing revealed that the research soil isolates use arabinose, xylose, mannitol, glucose, galactose, fructose, maltose, sorbitol, glycerol, dextrin, starch, rhamnose and dulcitol (with the formation of alkali) as the only source of carbon. There is an active use of mineral forms of nitrogen: ammonium salts and nitrates, amino acids and proteins. The isolates hydrolyse casein, gelatine, starch, and when grown in milk with litmus, the litmus is restored. They have catalase activity and were found to be oxidase-positive. Biochemical testing using the API test system revealed that the bacterial isolates under study differed in the spectrum of fermentable carbohydrates and nitrate reduction. Under conditions of deep fermentation, isolates H38 and H40 showed the ability to grow at elevated temperature ranges (40°C) for 48 hours (upon the onset of spore formation). As a result of the studies, it was shown that by key morphological and biochemical features, strains H3, H10, H13, H36, H38, H40, H43, H45 are related to the reference strain *B. subtilis* 8a and belong to the genus *Bacillus* sp. *subtilis*.

Comparing the results obtained in the study with the results described in the scientific publications of scientists, it was noted that the morphological and physiological-biochemical characteristics of new bacterial isolates selected from the agroecocenosis of winter wheat deepens our knowledge from a fundamental point of view. Due to their biological properties, strains of the natural type H3, H10, H13, H36, H38, H40, H43, H45 can be promising for the development of effective technologies for the production of microbial preparations, as well as a comprehensive study of the mechanisms of plant-microbial interactions (by the type of induction transformations on the morphological, physiological, biochemical, genetic levels in the body). The obtained experimental data on the biological characteristics of new

strains of *Bacillus subtilis* – metabolite producers, adapted to the conditions of the rhizosphere of winter wheat, confirm the relevance of the dissertation work.

Model studies determined the specifics of the effect of new strains of *B. subtilis* (H3, H10, H13, H36, H38, H40, H43, H45) on the development of winter wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) in the case of the use of inoculating bacterial cultures (culture liquids of strains of *B. subtilis* in various technological forms and dilutions). It was established that at dilutions of 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 the stimulating effect of bioagents is observed, and the maximum effect is achieved at dilution of 1:100. It was shown that *B. subtilis* inoculants applied to seeds in mature technological forms (spore culture,  $2,0 \times 10^7$  cells per seed) had the greatest positive effect on the germination of wheat seeds. The germination energy of *Triticum aestivum* L. seeds increases when interacting with *B. subtilis* inoculants up to 96,5%, and the raw mass of seedlings increases by 84,0-109,6%, depending on the variant of the experiment, compared to the control, which indicates the growth-stimulating properties of the new strains. It has been proven that the use of mature spore cultures of *B. subtilis* H38, H40 and H45 results in an increase in the mass of roots by 4,8-11,3% compared to the control without sterilization. When treated with culture fluids of strains of *B. subtilis* H3, H10, H13, H36, H43 in the form of vegetative cells, the mass of roots decreases by 11,8-44,0% compared to the control.

It has been confirmed that pre-sowing seed treatment remains the most affordable and effective agricultural measure today. Since the plant-microbial interaction (colonization of the rhizosphere, phylloplanes of plants; production of antimicrobial metabolites, physiologically active, phytohormonal substances of auxin, gibberellin, cytokinin nature and vitamins; induction of systemic resistance in the plant, etc.) is considered as an important mechanism of biological control of agricultural systems.

For the first time, the manufacturability of *B. subtilis* H38, H40 and H45 strains and the prospects of their use as effective inoculants were confirmed, in particular for the assessment of phytostimulating and regulatory properties of the microbial agent and the course of photochemical activity of winter wheat plants during ontogenesis.

The stability of the technological characteristics of *B. subtilis* strains H38, H40, H45 was established both during deep cultivation in liquid LB medium for up to 72 hours (spore titer from 1,89 to 2,43 billion spores/ml KR) and during further storage of the culture liquid (KR) for 60 days in the temperature range of 18-20°C (the spore titer was 1,81-2,33 billion spores/ml, respectively).

The assessment of the effect of bacterial inoculants *B. subtilis* on the photosynthetic apparatus of test plants of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) is given, and the high informativeness of induced changes in chlorophyll fluorescence (IFH) in the structural organization of chloroplasts of wheat seedlings according to a set of parameters (from initial, maximum to stationary levels) fluorescence, as well as viability index). The perspective of using *B. subtilis* bacterial inoculants in the aspect of photochemical activity of winter wheat plants in the process of ontogenesis has been proven, which has scientific and practical significance for ecological monitoring, assessment of plant resistance and the introduction of biological agents in the technologies of growing agricultural crops.

The concept of antagonistic properties of *B. subtilis* bacteria, which have a perspective for the biotechnology of obtaining effective antifungal products, has been expanded. Thus, according to the spectrum of antagonistic activity, new strains of *B. subtilis* H38, H40 were characterized by high activity against phytopathogenic bacteria *Pectobacterium carotovorum* 8982, *Xanthomonas campestris* 8003b, as well as *Pseudomonas syringae* ssp., in particular *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 and *P. syringae* pv. *syringae* 8511. Strains of *B. subtilis* H10, *B. subtilis* H36 demonstrated average antagonistic activity against the above-mentioned test phytopathogens. It was shown that the supernatant fraction of the culture fluid of *B. subtilis* strains has an average antagonistic activity against the ecologically plastic test micromycete *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2, which is capable of synthesizing trichothecene toxins. Thus, the zone of inhibition of the growth of the above-mentioned micromycete was from 16 to 18 mm in variants with 72-hour periodic cultivation of bacteria. The *B. subtilis* H40 strain differed from other research cultures and showed high activity (zone of inhibition of the growth of the test

micromycete within 24-25 mm). Already on the tenth day of the experiment (in variants with 120 hours of cultivation of *B. subtilis* strains), the antagonistic activity of the supernatant of *B. subtilis* H10, *B. subtilis* H36, *B. subtilis* H38, *B. subtilis* H40 and *B. subtilis* IMV B-7516 gradually decreased, but was not included in the group of weak activity (level not less than 12 mm). For the phytopathogenic organism *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45, a similar trend of the manifestation of an average level of antagonistic activity of metabolites of *B. subtilis* strains was observed, but the indicators of inhibition of the micromycete test culture by the supernatant of *B. subtilis* H10, *B. subtilis* H36 and *B. subtilis* H38 strains significantly decreased (10 mm) in the 120-hour accumulation options metabolites. Antagonistic activity of *B. subtilis* strains with indicator test phytopathogens *Gaeumannomyce* and *Pythium* was more pronounced in variants with *B. subtilis* H40 and *B. subtilis* H36. Changes in the nature of activity (toward its decrease) were observed in variants with *B. subtilis* H38 and *B. subtilis* H10 strains. Therefore, it was established for the first time that strains of *B. subtilis* H38, H40 actively affect phytopathogenic micromycetes and bacteria. This reveals the possibilities of using new bioagents *B. subtilis* H38, H40 as a basis for creating a new generation microbial drug with the function of phytocontrol of diseases of various etiologies.

For the first time, the ability of the *B. subtilis* H38 strain to form a full-fledged biofilm on the root system of winter wheat, which is functionally capable of controlling and protecting agricultural plants from phytopathogenic forms of microorganisms, was revealed after reaching technological maturity. It was shown that the *B. subtilis* H38 strain, which was introduced into the soil with winter wheat seeds, effectively took root in the rhizosphere of the culture, while the degree of survival of the *B. subtilis* H38 strain depended on the selected experimental antibiotic, in particular streptomycin, kanamycin. It was established that on the 50th day of the model experiment, the population of the ST-resistant mutant of the *B. subtilis* H38 strain was 2,6 million CFU/g of dry soil, which is 30,0% higher than the control. Regarding the dynamics of the number of bacteria resistant to kanamycin strain *B. subtilis* H38, an increase in survival of bacteria was observed, their number was 3,5

million CFU/g of dry soil of the rhizosphere of winter wheat (compared to 2,5 million CFU in the control, in which naturally resistant bacteria were studied *B. subtilis*). It has been proven that biofilms can be considered as an additional profile of active competition of the rhizospheric microbiome in the environment.

In order to detect antimicrobial activity in the rhizosphere soil (or directly in the soil) during the artificial enrichment of the corresponding substrate-environment with cultures of microorganisms with antagonistic properties, it is important to study their ability to take root in the soil, while identifying and analyzing the manifestation of active competition with various representatives of the soil biome in the rhizosphere of plants. Using the obtained antibiotic-resistant mutants of the strain *B. subtilis* H38 (resistant to streptomycin, kanamycin), the ability of *B. subtilis* H38 to take root in the rhizosphere soil of winter wheat was studied in a model vegetation experiment. The maximum concentration of antibiotics for *B. subtilis* H38 was 1100 µg/ml (ST), 120 µg/ml (CA). The conducted studies showed that the population of the ST-resistant mutant of the *B. subtilis* H38 strain already on the 12th day of the experiment was 4,8 million CFU/g of dry soil, and in the control it was 3,9 million CFU. When comparing the obtained initial and final data of the model study, it is shown that already on the 50th day of the experiment, the number of the ST-resistant mutant of the strain *B. subtilis* H38 decreased by 1,8 times. The number of ST-resistant mutant of *B. subtilis* H38 strain was up to 2,6 million CFU/g of dry soil, which was 30,0% higher than the control. A more pronounced antibacterial effect was found for the experimental kanamycin, which significantly affects the population of microorganisms in the rhizosphere soil. During 36 days, the number dynamics of the KA-resistant mutant strain *B. subtilis* H38 decreased to 4,7 million CFU/g of dry soil (the decrease was observed on average by 1,4% compared to the control variant). On the 50th day of the study, the number of kanamycin-resistant bacteria strain *B. subtilis* H38 was 3,5 million CFU/g of dry soil of the rhizosphere of winter wheat (for 2,5 million CFU in the control, naturally resistant bacteria). It was shown that the *B. subtilis* H38 strain, which was introduced into the soil with winter wheat seeds, took root effectively in the rhizosphere of the culture, while the degree of survival of the *B.*



*subtilis* H38 strain depends on the selected antibiotic, in particular streptomycin, kanamycin.

The high economic efficiency of inoculation with the new *B. subtilis* H40 strain in the cultivation of winter wheat has been proven. Pre-sowing inoculation significantly saves resources (with additional costs calculated per 1 ha of only 1,0%). In addition, the use of the *Bacillus subtilis* H40 strain as an inoculant is economically feasible, justified and contributes to the rational use of energy resources in agricultural production (reducing the cost of production and increasing its profitability by 21,7%).

**Key words:** soil rhizosphere bacteria *Bacillus subtilis*, physiologically active substances, winter wheat, inoculant, growth stimulation, antagonism, plant-microbial interaction.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

**Статті у наукових фахових виданнях України та виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних Scopus, Web of Science**

1. Патика М. В., Тонха О. Л., Сінченко В. М., **Гончар А. М.**, Патика Т. І. Особливості формування структурово-функціонального складу мікробіому чорнозему цілинного в степу України. Мікробіологічний журнал. 2019. №81(4). С. 90–106. DOI: <https://doi.org/10.15407/microbiolj81.04.090> (Здобувачкою проведено аналіз літературних даних, мікробіологічні дослідження мікроорганізмів різних фізіологічних груп на поживних середовищах, аналіз отриманих результатів, узагальнення даних, написання та підготовка статті до друку).
2. **Гончар А. М.**, Тонха О. Л., Патика М. В., Макаrchук О. С. Особливості зміни чисельності та складу мікробіому ризосфери пшениці озимої в процесі онтогенезу. Plant And Soil Science. 2021. №12(3). С. 56–65. DOI: <https://doi.org/10.31548/agr2021.03.0056> (Здобувачкою проведено польові та лабораторні дослідження з подальшими обрахунками даних щодо показників чисельності та складу мікробіому ризосфери пшениці озимої, підготовлено статтю до друку).
3. Borko Yu. P., Patyka M. V., Boyko M. V., **Honchar A. M.**, Sinchenko V. M. The features of taxonomic structure formation of soil microbial biome in *Beta vulgaris* rhizosphere. Мікробіологічний журнал. 2022. №84(1). С. 3–14. DOI: <https://doi.org/10.15407/microbiolj84.01.003> (Здобувачкою проведено аналіз літературних даних, мікробіологічні дослідження, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку).
4. **Honchar A.**, Tonkha O., Patyka N., Lykholat Y., Patyka T. Morphological and physiological-biochemical variability of isolates of spore-forming bacteria selected from the agrocenosis of winter wheat. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2021. №12(4). С. 588–593. DOI: <https://doi.org/10.15421/022180>

(Здобувачкою проведено аналіз літературних джерел, комплекс мікробіологічних, фізіолого-біохімічних досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку).

5. **Гончар А. М.**, Патика М. В. Вплив бактерій *Bacillus subtilis* на стан і активність фотосинтетичного апарату рослин пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.). Сільськогосподарська мікробіологія. 2022. №36. С. 28–35. DOI: <https://doi.org/10.35868/1997-3004.36.28-35> (Здобувачкою проведено аналіз літературних джерел, мікробіологічні, інструментальні дослідження, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку).

6. **Гончар А. М.**, Тонха О. Л., Патика М. В. Особливості впливу штамів *Bacillus subtilis* на розвиток *Triticum aestivum* L. у разі застосування інокуляційних культур. Plant And Soil Science. 2023. №14(3). С. 35–46. DOI: <https://doi.org/10.31548/plant3.2023.35> (Здобувачкою проведено аналіз літературних даних, проведено модельні, мікробіологічні дослідження, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку).

#### Тези наукових доповідей

7. **Гончар А. М.**, Тонха О. Л., Патика М. В. Перспективи реалізації біологічного потенціалу *Bacillus subtilis* в агроценозах злакових культур. Біотехнологія: звершення та надії: VIII Міжнародна науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених, м. Київ, 15 листопада 2019 року: тези доповіді. Київ, 2019. С. 17–18. (Здобувачкоюю опрацьовано та проаналізовано наукові джерела та підготовлено матеріали до друку).

8. **Гончар А. М.**, Тонха О. Л., Патика М. В. Дослідження мікробних ізолятів з ризосфери пшениці озимої різних сортів вітчизняної селекції. Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві: Наукова конференція молодих вчених, м. Чернігів, 27-28 жовтня 2020 року: тези доповіді. Чернігів, 2020. С. 78. (Здобувачкоюю проведено польові та лабораторні дослідження щодо мікробіологічного аналізу ізолятів, виділених з ризосфери пшениці озимої, підготовлено матеріали до друку).

9. **Гончар А. Н.**, Тонха О. Л., Патыка Н. В. Сигналинг и полифункциональность ризосферных бактерий *Bacillus subtilis* в посевах пшеницы. Биологически активные препараты для растениеводства: научное обоснование – рекомендации – практические результаты, daRostim: XVI Международная научно-практическая конференция, г. Минск, 22 октября 2020 года: тезисы доклада. Минск, 2020. С. 55–57. *(Здобувачкою опрацьовано та проаналізовано наукові джерела, проведено комплекс мікробіологічних досліджень та підготовлено матеріали до друку).*

10. Borko Yu., **Honchar A.** Microbial transformation of carbon compounds in chernozem typical at the different agricultural use. Молодь та сучасні проблеми мікробіології і вірусології (Youth and modern problems of microbiology and virology): Науково-практична конференція молодих дослідників, м. Київ, 23–26 листопада 2020 року: тези доповіді. Київ, 2020. С. 8. *(Здобувачкою опрацьовано та проаналізовано наукові джерела, проведено мікробіологічні дослідження та підготовлено матеріали до друку).*

11. **Гончар А. М.**, Тонха О. Л., Патики М. В. Мікробіом ризосфери пшениці озимої та бактерії *Bacillus subtilis* – продуценти біоактивних сполук. Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур: IX Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених і спеціалістів, с. Центральне, 23 квітня 2021 року: тези доповіді. Центральне, 2021. С. 33. *(Здобувачкою проведено польові та лабораторні дослідження щодо аналізу мікробіому ризосфери пшениці озимої, підготовлено матеріали до друку).*

12. Борко Ю. П., Бойко М. В., **Гончар А. М.** Вплив агрозаходів на динамку показників родючості ґрунту в агроценозі буряка цукрового. Збалансоване управління ґрунтовими ресурсами – запорука сталого розвитку агросфери: Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених та спеціалістів, м. Харків, 2–3 червня 2021 року: тези доповіді. Харків, 2021. С. 17–19. *(Здобувачкою опрацьовано та проаналізовано наукові джерела та підготовлено матеріали до друку).*

13. **Гончар А. М.**, Тонха О. Л., Пати́ка М. В. Варіабельність мікробіому ризосфери пшениці озимої в процесі онтогенезу. Біологічні аспекти оптимізації продукційного процесу культурних рослин: Всеукраїнська науково-практична онлайн-конференція, яка присвячена 60-річчю створення ІСМАВ НААН, м. Чернігів, 25 жовтня 2021 року: тези доповіді. Чернігів, 2021. С. 60–62. *(Здобувачкою опрацьовано та проаналізовано наукові джерела, проведено мікробіологічні, інструментальні дослідження мікробіому різних сортів пшениці озимої та підготовлено матеріали до друку).*

#### **Науково-методичні рекомендації**

14. Пати́ка М. В., Пати́ка Т. І., **Гончар А. М.** Рациональне застосування мікробних препаратів на основі бактерій роду *Bacillus* для контролю шкочочинних організмів: [науково-методичні рекомендації]. Київ, 2019. 34 с. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їх узагальнення і підготовлено матеріали до друку).*

15. Пати́ка М.В., Тонха О.Л., Пати́ка Т.І., **Гончар А.М.** Методичні рекомендації молекулярно-біологічної оцінки ґрунтового біому, об'єктів навколишнього середовища та детекція прокаріот: [науково-методичні рекомендації]. Київ, 2022. 52 с. *(Здобувачем проведено аналіз та узагальнення матеріалів, підготовлено рекомендації до друку).*

16. Пати́ка М.В., Тонха О.Л., Волкогон В.В., Пати́ка Т.І., **Гончар А.М.**, Волкогон К.І. Науково-методичні рекомендації з використання систем землеробства для оптимізації мікробіологічної складової ґрунту: [науково-методичні рекомендації]. Київ, 2022. 37 с. *(Здобувачем проведено аналіз та узагальнення експериментальних даних, підготовлено матеріали до друку).*

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ .....</b>	<b>24</b>
<b>ВСТУП.....</b>	<b>25</b>
<b>РОЗДІЛ 1 ЗНАЧЕННЯ РИЗОСФЕРНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ДЛЯ АГРОБІОТЕХНОЛОГІЙ.....</b>	<b>34</b>
1.1 Загальна характеристика ризосферних спорових бактерій <i>Bacillus subtilis</i> .....	44
1.2 Фізіологічно активні метаболіти ґрунтових мікроорганізмів.....	57
1.3 Механізми біологічної активності <i>Bacillus subtilis</i> та спектр дії фізіологічно активних сполук в ризосфері злакових культур (взаємодія з рослинами) .....	65
1.4 Перспективи використання мікроорганізмів <i>Bacillus subtilis</i> як агентів мікробних препаратів для рослинництва, землеробства.....	73
Висновки до розділу 1 .....	80
<b>РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....</b>	<b>82</b>
2.1 Об'єкти дослідження.....	82
2.2 Методи дослідження.....	87
Висновки до розділу 2.....	103
<b>РОЗДІЛ 3 МІКРОБІОМ РИЗОСФЕРИ ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ: ОСОБЛИВОСТІ СКЛАДУ, ВАРІАБЕЛЬНІСТЬ ІЗОЛЯТІВ СПОРОУТВОРЮЮЧИХ БАКТЕРІЙ ЗА ДІАГНОСТИЧНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ ПРИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ .....</b>	<b>104</b>
3.1. Особливості зміни чисельності та складу мікробіому ризосфери пшениці озимої в процесі онтогенезу .....	105
3.2. Морфологічна та фізіолого-біохімічна варіабельність ізолятів спороутворюючих бактерій, відібраних з агроценозу пшениці озимої..	113
Висновки до розділу 3.....	124

<b>РОЗДІЛ 4 ОСОБЛИВОСТІ ВІДПОВІДІ РОСЛИН ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ НА ІНТРОДУКЦІЮ БАКТЕРІЙ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> – ПРОДУЦЕНТІВ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНИХ СПОЛУК І РЕГУЛЯТОРІВ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ .....</b>	<b>127</b>
4.1 Особливості впливу штамів <i>Bacillus subtilis</i> на розвиток <i>Triticum aestivum</i> L. у разі застосування інокуляційних культур .....	129
4.2. Вплив бактеріальних інокулянтів <i>Bacillus subtilis</i> на фотосинтетичний апарат рослин пшениці озимої ( <i>Triticum aestivum</i> L.).	139
Висновки до розділу 4.....	144
<b>РОЗДІЛ 5 СПЕКТР МІЖМІКРОБНОЇ ВЗАЄМОДІЇ БАКТЕРІЙ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> З ФІТОПАТОГЕННИМИ ОРГАНІЗМАМИ...</b>	<b>147</b>
5.1 Оцінка антагоністичних властивостей бактерій <i>Bacillus subtilis</i> .....	147
5.2 Конкурентоздатність ризосферних штамів бактерій <i>Bacillus subtilis</i> .....	155
5.2.1 Здатність до утворення біоплівки бактерій <i>Bacillus subtilis</i> на корінцях пшениці.....	155
Висновки до розділу 5.....	161
<b>РОЗДІЛ 6 ЕКОНОМІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ НОВИХ ШТАМІВ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> У ТЕХНОЛОГІЯХ ВИРОЩУВАННЯ ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ В АГРОЦЕНОЗАХ ЛІСОСТЕПУ</b>	
<b>УКРАЇНИ .....</b>	<b>164</b>
Висновки до розділу 6.....	171
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>173</b>
<b>РЕКОМЕНДАЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ .....</b>	<b>179</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>	<b>180</b>
<b>ДОДАТКИ .....</b>	<b>209</b>

# ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

<i>B. subtilis</i> –	<i>Bacillus subtilis</i>
ssp. –	скорочення від лат. species — вид; після родової назви
НІР <sub>05</sub> –	найменша істотна різниця
КАА –	крохмале-аміачний агар
КА –	поживне середовище картопляний агар
КР –	культуральна рідина
КУО –	колонісутворююча одиниця
МПА –	м'ясо пептонний агар
LB –	поживне середовище Лурія-Бертані
ГПА –	глюкозо-пептонний агар
СКР –	супернатант культуральної рідини
PGPR –	plant growth-promoting rhizobacteria (пер. з англ. – ризобактерії, що сприяють росту рослин)
БАР –	біологічно активні речовини
хв. –	хвилина часу
атм. –	позасистемна одиниця виміру тиску, атмосфера
л –	один літр
г –	один грам
млрд./мл –	мільярд на один мілілітр



## ВСТУП

**Актуальність теми.** Використання корисних бактерій роду *Bacillus* або продуктів їх метаболізму, що мають фунгіцидну, інсектицидну, бактерицидну, фіторегуляторну активність є актуальним напрямом для аграрної науки і виробництва [1, 16, 36]. Одним з найбільш активних продуцентів метаболітів, що позитивно впливає на рослини, є бактерії виду *Bacillus subtilis*, що сприяють росту рослин завдяки продукуванню фітогормонів, розчинення неорганічних фосфатів, синтезу органічних кислот, антагонізму до фітопатогенних мікроміцетів та ін. Дані властивості вивчено, в основному, у музейних штамів і ґрунтових ізолятів *B. subtilis*. На сьогодні відсутні відомості про зміну біологічних властивостей бацил (адгезивних, рістстимулюючих, антагоністичних), виділених в різні фази росту і розвитку рослин.

Специфічність набору метаболітів ґрунтових бактерій *Bacillus subtilis*, що адаптовані до умов ризосфери злакових культур, представляє інтерес для фундаментальних і прикладних досліджень [2, 37, 39], оскільки ще недостатньо даних відносно їх характеристики, функціональної спрямованості, мікробно-рослинної взаємодії в агроценозі пшениці озимої, спектру активності.

Особливу наукову та практичну цінність складають комплексні дослідження щодо скринінгу, дослідженню генетичного профілю, різноманіття спорових бактерій *B. subtilis* в різних еконішах, аналізу їх морфолого-культуральних, фізіолого-біохімічних ознак, властивостей продуцентів. Необхідно глибоке вивчення поліфункціональної активності бактерій *B. subtilis*, асоційованих з ризосферою культурних злакових рослин, пошук серед них цільового продуцента та вивчення його характеристик.

Крім важливого прикладного значення, дослідження представників *B. subtilis* та їх продуктів метаболізму з поліфункціональною активністю важливе також з точки зору фундаментальних досліджень, оскільки далеко не всі види ризосферних спорових прокаріот є вивченими на предмет складу та характеристик їх мікробних метаболітів. Дослідження біологічних властивостей спорових ризосферних бактерій *B. subtilis* та біологічно активних речовин, що

продукують дані біоагенти-продуценти мікробних препаратів, мають наукову цінність через призму рослинно-мікробних взаємодій (за типом індукційних трансформацій на морфологічному, цитологічному, фізіолого-біохімічному, генетичному рівнях в організмі) [3-5, 7].

Інтродукція корисних ґрунтових мікроорганізмів в агроценози є необхідним і дієвим трендом агротехнологій вирощування різних сільськогосподарських культур, ефективно сприяє поліпшенню живлення рослин, захисту від фітопатогенних організмів різної природи, підвищенню продуктивності культур, покращенню якісних показників продукції [8-11].

У зв'язку з цим актуальним та важливим є вивчення біологічних характеристик нового штаму бактерій *Bacillus subtilis* та пошук специфічних продуцентів метаболітів, адаптованих до умов ризосфери пшениці озимої.

#### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.**

Дисертацію виконано на кафедрі ґрунтознавства та охорони ґрунтів імені М.К. Шикучи агробіологічного факультету Національного університету біоресурсів і природокористування України у відповідності з науково-дослідною тематикою Міністерства освіти і наук України №110/101-Ф «Оцінка біорізноманіття та фітозахисних властивостей бактерій роду *Bacillus* для біоконтролю шкочинних організмів» на 2017-2019 рр. (номер державної реєстрації 0117U002554); науково-дослідної роботи Міністерства освіти і наук України №110/6-пр-2021 «Структура угруповань мікроорганізмів та спрямованість процесів мінералізації-синтезу органічної речовини в ґрунтах за різних систем удобрення сільськогосподарських культур», 2021-2022 рр. (номер державної реєстрації 0121U109961).

**Мета і завдання дослідження.** Мета дослідження полягає у вивченні біологічних характеристик штамів *Bacillus subtilis* та особливостей активізації специфічних продуцентів метаболітів, адаптованих до умов ризосфери пшениці озимої.

Досягнення мети роботи обумовило необхідність постановки та вирішення таких завдань:

- дослідити мікробіом ризосфери пшениці озимої та оцінити особливості якісного і кількісного складу прокаріотного комплексу;
- вивчити активність ізолятів *B. subtilis*, виділених з агроценозу *Triticum aestivum* L., за результатами мікробіологічних, фізіолого-біохімічних методів дослідження; провести ідентифікацію штамів-продуцентів *B. subtilis* та їх скринінг щодо цільових продуцентів метаболітів, які ефективно впливають на рослини пшениці озимої;
- дослідити особливості відповіді рослин пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) на інтродукцію бактерій *B. subtilis* – продуцентів біологічно-активних сполук і регуляторів фізіологічних процесів в залежності від фази вегетації;
- визначити спектр міжмікробної взаємодії бактерій *B. subtilis* з фітопатогенними організмами;
- провести розрахунки економічної ефективності застосування мікробних препаратів на основі *B. subtilis* у технології вирощування пшениці озимої.

*Об'єкт дослідження* – особливості розвитку і функціонування *B. subtilis* в ризосфері пшениці озимої.

*Предмет дослідження* – біологічні властивості штаму-продуценту *B. subtilis* та його вплив на рослини пшениці озимої.

**Методи дослідження.** Теоретичною і методологічною базою дослідження є наукові розробки вітчизняних і зарубіжних вчених щодо біологічних властивостей бактерій роду *Bacillus* (*B. subtilis*) та особливостей мікробно-рослинної взаємодії в ризосфері зернових культур (пшениці озимої). У процесі обґрунтування теоретичних та практичних питань дослідження використовувалися наступні наукові методи: мікробіологічні (чисельність основних прокаріотних груп у ризосфері пшениці озимої, синтез метаболітних комплексів, міжмікробна взаємодія); інструментальні (світлова мікроскопія); фізіолого-біохімічні; вегетаційні, польові; математично-статистичні.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше з агроценозу пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) виділено 29 ізолятів бактерій та вивчено їх морфолого-культуральні, фізіолого-біохімічні особливості. При вивченні чисельності та складу ґрунтових мікроорганізмів у ризосфері 20 сортів пшениці озимої вітчизняної селекції у процесі онтогенезу виявлено варіабельність мікробної біомаси по сортовим варіантам та зміна мікробіому на користь екологопластичних бацил.

За результатами скринінгу з ризосфери пшениці озимої відібрано 19 ізолятів бактерій, які віднесено до колоніально-морфологічного різноманіття R-типу. Доведено здатність ізолятів рости при широких діапазонах рН середовища від 4,5 до 8,0, що вказує на їх високі адаптивні властивості та життєздатність. Встановлено, що ізоляти Н10 і Н45 мають властивості рости при підвищених температурах культивування (+37...+40°C).

Різнманітність морфологічних та біохімічних особливостей спороутворюючих бактерій обумовлює відмінності в спектрі їх дії і прояві біологічних властивостей в середовищі. За ключовими морфологічними, фізіологічними і біохімічними ознаками штами природного типу Н3, Н10, Н13, Н36, Н38, Н40, Н43, Н45 споріднені з референтним штамом *B. subtilis* 8a та віднесено до роду *Bacillus* sp., виду *B. subtilis*.

Розширено уявлення про особливості відповіді рослин пшениці озимої на інтродукцію бактерій *B. subtilis* – продуцентів біологічно-активних сполук і регуляторів фізіологічних процесів в залежності від фази вегетації. Доведено, що при розведеннях інокуляційних бактеріальних культур 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 спостерігається стимулювальна дія штамів *B. subtilis* Н3, Н10, Н13, Н36 (від мінімальної стимуляції за розведення культуральної рідини 1:500 до максимальної – за розведення 1:100). Показано доцільність застосування зрілих спорових культур *B. subtilis* ( $2,0 \times 10^7$  клітин на насінину), що дає можливість прояву рістстимулювальних властивостей нових штамів. Встановлено, що за використання зрілих спорових культур *B. subtilis* Н38, Н40 і Н45 відбувається зростання маси коренів на 4,8-11,3% порівняно з контролем без бактеризації.

При обробці культуральними рідинами штамів *B. subtilis* Н3, Н10, Н13, Н36, Н43 у формі вегетативних клітин маса коренів виявилася меншою на 11,8-44,0% порівняно з контролем.

Встановлено стабільну технологічну активність штамів *B. subtilis* Н38, Н40, Н45 як при глибинному культивуванні в рідкому середовищі LB до 72 годин (титр спор від 1,89 до 2,43 млрд. спор/мл КР), так і при подальшому зберіганні культуральної рідини упродовж 60 діб в температурному діапазоні 18-20°C (титр спор стабільний в межах 1,81-2,33 млрд. спор/мл відповідно).

Вперше дана оцінка впливу бактеріальних інокулянтів *B. subtilis* Н38, Н40, Н45 на фотосинтетичний апарат тест-рослин пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) в модельних умовах, яка дозволила виявити високу інформативність індукційних змін флуоресценції хлорофілу у структурній організації хлоропластів проростків пшениці за комплексом параметрів (на початковому, максимальному, стаціонарному рівнях флуоресценції та індексу життєздатності). У варіантах з бактеризацією технологічними штамами *B. subtilis* зі різних розведень встановлено ефективність фотосинтезу в оптимальних межах (індекс життєздатності  $R_{fd}$  відповідає нормальним показникам квантової ефективності фотосинтезу ( $\geq 1,50$ -2,50)).

Визначено спектр міжмікробної взаємодії бактерій *B. subtilis* з фітопатогенними організмами (основними збудниками хвороб пшениці озимої). За спектром антагоністичної активності нові штами *B. subtilis* Н38, Н40 виявилися високоактивними відносно фітопатогенних бактерій: *Pectobacterium carotovorum* 8982 (зона затримки росту 23-21 мм), *Xanthomonas campestris* 80036 (зона затримки росту 37-30 мм), *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 (зона затримки росту 22-21 мм), *P. syringae* pv. *syringae* 8511 (зона затримки росту 26-24 мм). Штами *B. subtilis* Н10, *B. subtilis* Н36 проявили середню активність (зони затримки росту не перевищили 20,0 мм).

Встановлено, що біологічні активні речовини, які синтезуються штамом *B. subtilis* Н40 під час культивування та накопичуються у поживному середовищі, інгібують широкий спектр фітопатогенних мікроміцетів: *Fusarium*

*sporotrichioides* Sherb. 23.2 (зона пригнічення росту мікроміцету в межах 24-25 мм), *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45 – 12-14 мм. Пролонгована міжмікробна взаємодія надосадових рідин *B. subtilis* H10, *B. subtilis* H36, *B. subtilis* H38, *B. subtilis* H40 та *B. subtilis* IMB B-7516, отриманих після 120 годинного культивування, зафіксована до рівня зони інгібування *Fusarium* не менше 12 мм на 10 добу експерименту. Зона затримки росту *Bipolaris sorokiniana* на третю добу продукування екзометаболітів штамами *B. subtilis* H10, *B. subtilis* H36 і *B. subtilis* H38 при періодичному культивуванні спостерігалась в межах 23-29 мм. Антагоністична активність надосадової рідини штамів *B. subtilis* H40 та *B. subtilis* H36 щодо індикаційних мікроміцетних тестів *Gaeumannomyces* та *Pythium* показала максимальні зони пригнічення 13,0 мм, 8,0 мм; 14,0 мм, 8,5 мм для кожного мікроміцету відповідно.

Встановлено особливості формування біоплівки штамами *B. subtilis* H10, H36, H38 і H40 при взаємодії з кореневою системою рослин пшениці (*B. subtilis* H10 – початковий рівень; *B. subtilis* H38 – повноцінне формування біоплівки).

Показано, що штам *B. subtilis* H38, який внесено в ґрунт з насінням озимої пшениці, ефективно приживався в ризосфері культури, при цьому ступінь приживаності штаму залежить від його біологічних характеристик та вибраного антибіотика (стрептоміцину, канаміцину).

**Практичне значення отриманих результатів.** Виявлені біологічні характеристики штамів *B. subtilis* мають практичну перспективу для технології отримання ефективної мікробіологічної продукції для біометоду захисту рослин та контролю фітопатогенних організмів.

Підтверджена технологічність штамів *B. subtilis* H38, H40 і H45 та перспективність їх використання в якості ефективних інокулянтів (для тестування фітостимуляційних, регуляторних властивостей мікробного агента або перебігу фотохімічної активності рослин в процесі онтогенезу). При

виросуванні пшениці озимої доцільно використовувати агробіотехнології з превентивною та завчасною обробкою насіння та вегетуючих рослин інокулянтном на основі нових штамів *B. subtilis* з титром не менше 2,3 млрд. спор/мл КР і розведенням КР 1:100, що забезпечує ефективну рослинно-мікробну взаємодію, покращення фізіологічного стану і продуктивності рослин.

Доведено економічну доцільність застосування штаму *Bacillus subtilis* Н40 як інокулянту при вирощуванні пшениці озимої, що сприяє раціональному використанню енергоресурсів у сільськогосподарському виробництві, знижує собівартість продукції та підвищує її рентабельність на 21,7%.

Результати наукових досліджень використано для підготовки рекомендацій з раціонального застосування мікробних препаратів на основі бактерій роду *Bacillus* для контролю шкочинних організмів, а також у освітньому процесі при викладанні дисциплін «Сільськогосподарська мікробіологія» ОКР Бакалавр спеціальності 201 «Агрономія» НУБіП України.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є самостійно виконаною науковою працею автора. Здобувачкою особисто здійснено інформаційний пошук та проаналізовано літературні джерела з тематики дослідження, визначено мету та завдання досліджень, розроблено схеми експериментів, проведено підбір методик та виконано відповідні лабораторні, вегетаційні та польові дослідди, здійснено аналіз результатів, їх статистичну обробку, узагальнення, формулювання основних положень і висновків, підготовлено матеріали до публікації. Підготовка матеріалів до публікації за темою дисертації проводилась самостійно та у співавторстві (додаток Б). У працях, які опубліковані у співавторстві, частка авторства здобувача полягає в плануванні та виконанні експериментальних досліджень, узагальненні та опрацюванні результатів, підготовці рукописів до друку. Планування та аналіз результатів виконано спільно з науковим керівником, доктором сільськогосподарських наук, професором О. Л. Тонхою.

Автор висловлює щире подяку співробітникам кафедри ґрунтознавства та охорони ґрунтів імені професора М.К. Шикуні, кафедри генетики, селекції та

насінництва імені професора М.О. Зеленського НУБіП України за допомоги і співпрацю при написанні та підготовці дисертаційної роботи.

**Апробація матеріалів дисертації.** Результати досліджень, основні положення та висновки дисертації доповідались та обговорювались на засіданнях науково-технічної ради НДІ рослинництва та ґрунтознавства агробіологічного факультету НУБіП України, а також на наукових конференціях, з'їздах: VIII Міжнародна науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії», НУБіП України (м. Київ, 15 листопада 2019 р.); Наукова конференція молодих вчених «Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві», Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН України (м. Чернігів, 27-28 жовтня 2020 р.); XVI Международная научно-практическая конференция daRostim. Биологически активные препараты для растениеводства: научное обоснование –рекомендации – практические результаты (г. Минск, 22 октября 2020 г.); Науково-практична конференція молодих дослідників «Молодь та сучасні проблеми мікробіології і вірусології» (Youth and modern problems of microbiology and virology), Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України (м. Київ, 23-26 листопада 2020 р.); IX Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених і спеціалістів «Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур» (с. Центральне, 23 квітня 2021 р.); Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених та спеціалістів, присвяченої 65-річчю заснування Національного наукового центру «Інститут ґрунтознавства та агрохімії імені О.Н. Соколовського» (м. Харків, 2-3 червня 2021 р.); Всеукраїнська науково-практична онлайн-конференція "Біологічні аспекти оптимізації продукційного процесу культурних рослин", яка присвячена 60-річчю створення ІСМАВ НААН (м. Чернігів, 25 жовтня 2021 р.).

**Публікації.** Основні положення дисертаційного дослідження викладено у 16 наукових працях, з яких 3 статті у провідних наукових фахових виданнях України, 3 – у виданнях, які включені до міжнародних наукометричних баз



Scopus, Web of Science, 7 тез наукових доповідей, 3 науково-методичні праці (рекомендації).

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, експериментальної частини, яка містить шість розділів, висновків, рекомендацій виробництву, списку використаних джерел, додатків. Загальний обсяг роботи становить 215 сторінок. Робота містить 23 таблиці, 11 рисунків і 2 додатки. Список використаних джерел налічує 296 найменувань.

## РОЗДІЛ 1

### ЗНАЧЕННЯ РИЗОСФЕРНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ДЛЯ АГРОБІОТЕХНОЛОГІЙ

Одним із стратегічних напрямів сучасного землеробства є розкриття його адаптаційного потенціалу – використання інноваційних біологічних засобів відтворення родючості ґрунту та отримання екологічно безпечної продукції рослинництва. Серед таких засобів, що застосовуються в агробіотехнологіях вирощування сільськогосподарських культур, важливу роль відіграють мікробні агенти поліфункціональної дії для забезпечення трофічної структури метаболізму біологічних систем в ризосфері рослин, біопротекторної дії, індукції системної стійкості рослин від фітопатогенних організмів [1-3].

Для здійснення ефективної інтродукції в зернові агроценози ґрунтових бактерій роду *Bacillus* необхідно враховувати сучасні аспекти, які пов'язані з характеристикою корисної ризосферної мікробіоти, особливостями рослинно-мікробної та міжмікробної взаємодії, умовами активного функціонування перспективних штамів в системі «ґрунт-рослина», а також з їх специфічними властивостями і, відповідно, з урахуванням агротехнологій вирощування конкретної культури [4-7].

Використання ґрунтових мікроорганізмів для агроєкосистем розглядається як ефективний напрям корекції мікробіому ризосфери, покращення ростових та функціональних показників розвитку рослин та підвищення їх продуктивності [1, 8, 9]. Саме цей напрям досліджень відкриває перспективи розвитку мікробних біотехнологій для створення ефективних симбіотрофних і асоціативних рослинно-мікробних багатокомпонентних систем, які сприятимуть максимальній реалізації продуктивності агрофітоценозів. Через розкриття механізмів формування рослинно-мікробних ризосферних систем та підсилення їх частки конкурентоздатності до стресових антропогенних факторів стає можливим створення інноваційних біотехнологічних розробок для управління біологічними процесами у зернових агроценозах [1, 10, 11].

У наукових публікаціях повідомляється про те, що рослинно-мікробна взаємодія ґрунтується не лише на самих трофічних зв'язках. Встановлено, що рослини мають набір генів, експресія яких здійснюється лише в присутності мікроорганізмів [5, 12]. Різноманітність і структура бактеріальних груп в ризосфері значно диференційована залежно від генотипу рослини, типу ґрунту, рівня землеробства, а також особливостей і морфології кореневої системи [13].

Таким чином, від видоспецифічності рослин, групи ризосферних мікроорганізмів залежить рівень генетичного потенціалу, що обумовлює формування рослинно-мікробних систем, ефективність симбіозу, доступність поживних речовин та імовірність розвитку збудника патогенної інфекції, в системі контролю чисельності яких провідна роль пов'язана саме з конкретним мікробіомом, який конкурує та проявляє антагоністичну активність щодо збудників хвороб рослин. Здатність бактерій роду *Bacillus* нівелювати фітопатогенні організми може бути також зумовлена як високою швидкістю зайняття своєї екологічної ніші в ризосфері, так і біосинтезом антибіотичних речовин та інших антифунгіцидних метаболітів.

На сьогодні рослинна ризосфера є унікальним ґрунтовим середовищем, особливість якого полягає в постійному надходженні низькомолекулярних сполук у вигляді корневих ексудатів. У ризосфері підтримується велика кількість метаболічно активної мікробіоти, біомаса і поліморфізм якої може бути вищим на кілька порядків, ніж в загальному показнику орного шару ґрунту. Розмір ризосфери рахується приблизно від 0 до 8 мм в діаметрі, кількість мікробних клітин в ній може перевищувати їх число в навколишньому ґрунті в сотні разів [24].

Отже, ризосфера рослин являє собою перспективний середовищний ресурс для пошуку нових універсальних агентів мікробних препаратів, що створюють потужний базис наукоємних біотехнологічних розробок для формування рослинно-мікробних взаємодій у агроценозах сільськогосподарських культур. При подальшому розвитку комплексних наукових досліджень основна увага зосереджена як на процесах, що протікають

в ризосфері, так й пов'язаних з діяльністю людини, особливо з аграрним виробництвом [1, 13, 14]. Проте, функціональні процеси, асоційовані з життєздатністю ґрунтових спорових бактерій, набагато ширше і можуть не обмежуватись виключно сільськогосподарськими екосистемами.

У наукових публікаціях повідомляється про те, що до антимікробних сполук належать нерибосомні пептиди родин сурфактинів, ітуринів, фенгіцинів та курстакінів, аміноглікозидні антибіотики (бутирозин, неотрегалозодіамін) тощо [38]. У деяких представників роду *Bacillus* морського походження було виявлено антибіотики пептидної природи ряду нових класів (маріхізини, гагеостатини, бацилітетрини) та незвичайно модифіковані сполуки раніше відомих класів (наприклад, глікозильований макролактин W) [39].

Рослини вступають в складні взаємодії з ризосферними, ґрунтовими мікроорганізмами, утворюючи рослинно-мікробну систему з новими властивостями (симбіотична стратегія набуття нових функцій, симбіотрофна взаємодія і т.д.). В результаті функціональної інтеграції генетичних систем прокаріот і еукаріот (партнерів) виникає нова система або новий ступінь організації з відповідними ознаками. Це відбувається на рівні адаптаційних змін та популяційних процесів, що спостерігається серед ґрунтових мікроорганізмів.

В багатьох наукових публікаціях описано про рослинно-мікробні системи, які відіграють ключову роль у живленні рослин, їх захисту від патогенів та фітофагів, а також в адаптації до стресів і регуляції розвитку. Зв'язок між рослинами і ґрунтовою біотою набагато ширше і складніше, ніж просто продуцент і споживач. Обмін сигналами між рослинами і мікроорганізмами (назва — сигналінг), заселення кореневої системи рослин симбіонтами та інфікування патогенами має перспективи для проведення масштабних досліджень [1, 229].

Функціонування ґрунтової мікробіоти розглядається як один з найбільш важливих факторів, що впливають на рослинний організм. Протягом життєвого циклу рослини вступають у взаємодію з великою кількістю мікроорганізмів,

серед яких особливе місце займають ризосферні бактерії, мікроміцети, стрептоміцети, водорості, найпростіші, що відносяться до різних таксономічних груп.

Вони формують мікробіом прикореневої зони рослин. При цьому фітопатогенні організми, як відомо, уповільнюють ростові процеси [99]. Інші ризосферні мікроорганізми здатні позитивно впливати на розвиток рослин, сприяючи накопиченню вегетативної біомаси [121], підвищенню продуктивності, поліпшенню якості насіння та інше. Повідомляється, що ризобактерії можуть зумовлювати дію на представників інших видів і родів мікрофлори ризосфери [122].

Акцентуючи увагу на біоагентах *B. subtilis*, слід зазначити, що завдяки різним механізмам взаємодії вони є взаємовигідними для рослин, зокрема через оптимізацію надходження поживних речовин у рослини, антагонізм до інших мікроорганізмів, особливо патогенних, синтез регуляторів росту або посилення вторинних метаболічних шляхів, які безпосередньо пов'язані з підвищенням стресостійкості рослин. Застосування біопрепаратів на основі *B. subtilis* під зерновими (пшениця озима, пшениця яра, ячмінь) демонструє антагонізм проти патогенів, сприяє активізації схожості, збільшенню надземної біомаси і кореневої системи культур на фоні зараження ґрунтів фітопатогенами [79].

Повідомляється про те, що бактерії *B. subtilis* (S499) беруть участь в інгібуванні поширення такого патогенна як *Botrytis cinerea* на плодових культурах. Встановлено продукування антибіотичних речовин — ітурін і фенгіцин штамами бактерій *B. subtilis* (UMAF6614, UMAF6616, UMAF6639 і UMAF8561), які інгібують поширення борошнистої роси *Podosphaera fusca* [80].

Відмічається важливість застосування ґрунтових спорових бактерій *B. subtilis* для інокуляції різних сільськогосподарських культур в аграрному виробництві, що обумовлено винятковою взаємодією мікроорганізмів з культурами (стимуляція росту, оптимальний розвиток олійних, овочевих, зернових та інше).

Деякі штами бактерій *Bacillus* ssp. сприяють підвищенню схожості, активності та покращують розвиток рослин, а деякі ефективно підвищують розвиток кореневої системи та поглинання поживних речовин. Результати досліджень колонізації коренів рослин свідчать про рістстимулюючий вплив штамів *B. subtilis* на кореневу систему в ризосфері рослин, які перевищували ефективність аборигенної мікрофлори [1, 159, 178].

Комплексне використання органічних і неорганічних біодобрих сприяли високій врожайності сільськогосподарських культур на фоні поліпшення фізичних властивостей ґрунту, а також можливості знижувати кількість застосовуваних дорогих неорганічних добрив.

Таким чином, застосування штамів *B. subtilis* ефективно в якості біологічних добрив при вирощуванні різних рослин. Проблеми, пов'язані із застосуванням мікробних біопрепаратів, в тому числі на основі спорових бактерій *B. subtilis*, об'єднані з фізичними та хімічними факторами, такими як рН, вміст поживних речовин, вологість, температура, кількість органічної речовини в ґрунті та рівень біологічної взаємодії в ризосфері, все це визначає життєздатність і активність виділених філотипів мікроорганізмів. Застосування біопрепаратів на основі технологічних штамів *B. subtilis* в сучасних умовах розвитку аграрного виробництва привертає велику увагу, в основному, за рахунок своєї екологічності, підвищення розкриття природного потенціалу рослинно-мікробних систем і, в кінцевому рахунку, отримання оптимальної кількості органічної продукції рослинного походження.

Узагальнені літературні дані про властивості ризосферних мікроорганізмів дозволяють на сьогодні комплексно визначати їх рістстимулюючих потенціал, а також регуляторний вплив на формування і функціонування бобово-ризобіального симбіозу [120].

Застосування ґрунтових ризосферних мікроорганізмів, у т.ч. *B. subtilis*, в сучасних умовах розвитку аграрного виробництва привертає велику увагу, в основному, за рахунок своєї екологічності, підвищення розкриття природного потенціалу рослинно-мікробних систем і, в кінцевому рахунку, отримання

оптимальної кількості органічної продукції рослинного походження. Вивчення структури бактерій та їх функцій важливо не тільки для розуміння їх екологічної ролі і взаємодій з рослинами і їх патогенами, а й для застосування в сільськогосподарській мікробіології, біотехнології (рис. 1.1).



Рисунок 1.1 – Схема взаємодій рістстимулюючих бактерій в ризосфері рослин з урахуванням впливу на здоров'я людини і навколишнє середовище [46].

Здатність ризобактерій до мобілізації мінеральних елементів, азотфіксації, продукуванню ферментів і біологічно активних речовин, індукції системної стійкості, пом'якшення дії біотичних і абіотичних несприятливих чинників лежить в основі їх прямого і непрямого багатовекторного впливу на ріст і розвиток рослин, формування і функціонування мікробних популяцій ризосфери, а також родючість ґрунту (важливих складових для ефективної взаємодії мікро- і макросимбіонтів). Крім цього, участь ризосферних мікроорганізмів у багатьох процесах, що відбуваються в прикореневій зоні, дозволяє розглядати мікробні угруповання, що утворюються поблизу кореневої

системи сільськогосподарських рослин, як фактор регулювання формування симбіозу (наприклад, бобово-ризобіального), особливо на ранніх етапах.

Актуальними науковими питаннями залишаються дослідження властивостей ризосферних мікроорганізмів та їх біологічної активності, що в перспективі дозволяє розглядати прикореневу мікробіоту рослин не тільки з точки зору рістстимулюючої дії бактерій, але і як фактор регуляції формування ефективного симбіозу.

Вплив ризосферних мікроорганізмів на культурні рослини здійснюється за допомогою як прямих, так і непрямих механізмів. Це відображається на поліпшенні живлення рослин і активізації ростових процесів за рахунок продукування біологічно активних речовин і регулювання рівня фітогормонів. А також через непрямий вплив, який пов'язаний з пригніченням активності фітопатогенних організмів та індукуванням системної стійкості у рослин. Ризосферні бактерії відіграють надзвичайно важливу роль в захисті макроорганізму від дії абіотичних стресових факторів. Вільноіснуючі мікроорганізми прикореневої зони мають здатність відновлювати молекулярний азот атмосфери [50, 73, 123], формуючи в ризосфері пул доступних азотних сполук, які можуть бути використані рослинами для росту і розвитку, а також для компенсації витрат, понесених на встановлення ефективних взаємодій з ґрунтовими бактеріями.

Домінантними несимбіотичними мікроорганізмами ризосфери з функціями азотфіксуючої активності виступають бактерії *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter* та ін. [12, 124-126]. Спектр діазотрофних (асоціативна азотфіксація) бактерій постійно поповнюється новими таксонами. На даний час вважається, що до фіксації азоту з атмосфери здатні 80-90% всіх відомих бактерій [133-135]. Нітрифікуючи і денітрифікуючи мікроорганізми, які трансформують азот в ґрунті, також можуть побічно впливати на розвиток рослинно-мікробних взаємодій (наприклад, бобово-ризобіального симбіозу). Бацили, псевдомонади, азотобактер, везикулярно-арбускулярні мікроміцети є



найбільш відомими видами ризосферних мікроорганізмів, які характеризуються високою активністю мінералізації нерозчинних фосфорних сполук [127].

Бактерії прикореневої зони рослин, наприклад бактерії родів *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acidithiobacillus*, *Bacillus*, *Paenibacillus* і гриби *Aspergillus*, можуть вивільняти сполуки калію з мінералів, що входять до складу ґрунту [128, 129], переважно за рахунок продукування органічних кислот.

Ризосферні мікроорганізми можуть синтезувати різний набір речовин, які беруть регуляторну участь на різних етапах онтогенезу рослин. Повідомляється, що фенілоцтова і 4-гідроксифенілоцтова кислоти, що виділяються бацилами, індують формування коренів рослин і системну стійкість до дії рослинних грибних патогенів [130].

Індукція системної стійкості у рослин до фітопатогенів та підвищення стресостійкості до абіотичних факторів навколишнього середовища є важливим елементом рістстимулюючої дії ґрунтових бактерій. Мікроорганізми прикореневої зони знижують патогенез хвороб рослин, запускаючи процеси формування багаторівневого захисту макроорганізму [131], залучаючи при цьому речовини-елісатори (сідерофори, ліпополісахариди та інші сполуки). Вони здатні до продукування полісахаридів, які утримують вологу в прикореневій зоні або беруть участь у структуруванні ґрунту, можуть нівелювати дію сольового стресу, утилізувати важкі метали або індукувати синтез ряду речовин, пов'язаних з системою захисту рослин [132].

Літературні дані вказують на те, що інтродукція ризосферних бактерій в прикореневу зону макросимбіонта в монокультурі або в змішаних композиціях з ґрунтових бактерій може істотно впливати на різні фізіологічні та морфологічні аспекти формування рослинно-мікробних систем, пов'язаних безпосередньо з продукуванням активних метаболітів, розвитком рослини та популяції бактерій. Поряд з цим, повідомляється, що фізико-хімічні властивості ґрунту також можуть визначати характер формування і функціонування рослинно-мікробних систем за участю ризосферних бактерій [136].

Поліпшення ростових параметрів макроорганізму в умовах стресу може бути пов'язано з впливом ґрунтових бактерій на архітектуру кореневої системи культурної рослини (довжину, площу поверхні, об'єм кореня), а також поглинальну здатність кореня. Таким чином, використання різних біоагентів мікробних препаратів у рослинництві, землеробстві (так звані змішані препарати адаптованих бактерій, в тому числі і бактерій різних таксономічних груп) вважається доцільним агробіотехнологічним прийомом.

Ризосферні мікроорганізми (як агенти мікробних препаратів) можуть по-різному впливати на формування рослинно-мікробних систем в присутності інших представників прикореневій мікробіоти. Деякі ґрунтові бактерії при їх інтродукції в ризосферу рослини можуть стимулювати активність аборигенних ґрунтових популяцій мікроорганізмів [52, 78, 109] або впливати на активність і кількість інших фізіологічних груп мікробіоти (азотфіксуючих бактерій, актиноміцетів), а також на ферментативну активність ґрунту [137], впливаючи на ефективність взаємодій між рослиною та мікроорганізмом.

Бактерії прикореневої зони в ході формування симбіозу за їх участю знижують потребу рослин в мінеральних добривах. Тому вважається, що надійним індикатором екологічної доцільності застосування різних норм мінерального азоту може бути реакція ґрунтових ризосферних мікроорганізмів на концентрацію добрив у ґрунті (залежно від агрофону) [138, 139]. Зважаючи, що ризосферні бактерії відображають практично реакцію рослини щодо концентрацій сполук азоту, оскільки перебувають з нею в тісній просторовій і функціональній взаємодії, слід дійти висновку, що за реакцією мікроорганізмів можна відслідкувати й реакцію рослини на вміст мінерального азоту в ґрунті, а також рівень активності емісії  $N_2O$  і  $CO_2$  в агроценозах.

Широкомасштабне використання в сільському господарстві біопрепаратів на основі ризосферних бактерій стримується відсутністю стандартних технологій їх виробництва. В даний час існує необхідність розробки сучасних технологій отримання мікробних препаратів різного призначення на основі ризосферних бактерій.

Незважаючи на значний прогрес у вивченні ролі ризосферних мікроорганізмів у формуванні рослинно-мікробних взаємодій, залишається ще багато питань, відповіді на які розширять науково-практичні уявлення.

## 1.1 Загальна характеристика ризосферних спорових бактерій *Bacillus subtilis*

Аеробні спороутворюючі бактерії роду *Bacillus* широко поширені в природі та є важливими компонентами ґрунтового мікробного ценозу. Вони володіють високою біологічною активністю, зокрема синтезують різні за своєю природою і механізмом дії біологічно активні метаболіти, а також ферменти, полісахаридні комплекси з ад'ювантними, імуномодуючими властивостями, амінокислоти, вітаміни та інші сполуки, комплекси [2, 15].

Дослідження антагоністичних властивостей штамів р. *Bacillus* переважно спрямовані на виявлення та ідентифікацію антимікробних речовин [140], моніторинг експресії генів, що беруть участь у синтезі антибіотиків, та механізми індукції стійкості [141-145].

Незважаючи на те, що бацили описані вже більш як 100 років тому, систематика роду до цього часу розвивається і вдосконалюється. Науковий інтерес до спорових бактерій р. *Bacillus* пов'язаний з різноманітністю екологічних ніш, які вони займають (від різних форм паразитизму до коменсалізму, мутуалізму), специфічною будовою (здатність до утворення ендоспор) та здатністю до синтезу широкого спектру активних первинних і вторинних метаболітів [16, 17].

З використанням сучасних молекулярно-біологічних методів досліджень встановлено, що вид *B. subtilis* складається з групи споріднених видів і підвидів, які можна відокремити один від одного шляхом генетичного типування методом RAPD аналізу та за сиквенсом гену 16S рРНК [146].

В складі виду *B. subtilis* виявлено сукупність споріднених видів і підвидів, до яких відносять *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus velezensis* [147, 148].

Представники р. *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. mojavensis* та ін.) відносяться до найбільш чутливих та динамічних компонентів мікробних угруповань ґрунту,

особливо в умовах антропогенного навантаження і різнобічних стресів [18-20]. Багато штамів даної групи є продуцентами різноманітних антибіотичних речовин та бактеріоцинів (антимікробних пептидів або білків, які розглядають як альтернатива традиційним антибіотикам проти збудників хвороб рослин, а також як стимулятори росту для сільськогосподарських культур). Більшість антибіотиків, утворених бацилами, є нерібосомальними, вони синтезуються бактеріальною культурою в стаціонарній фазі росту. Практичний інтерес до бактеріоцинів спороутворювальних бактерій зумовлений не лише легкістю культивування продуцентів, але й фізіологічною різноманітністю та специфічними цитологічними рисами [274]. Важливо відзначити що, саме синтез біологічно активних сполук (бактеріоцинів), який відбувається на рибосомах, є їх принциповою характеристикою та відрізняє їх від нерідко хімічно схожих пептидних антибіотиків. Специфічність дії варіює, залежно від конкретного бактеріоцину, і може бути такою ж широкою, як у деяких антибіотиків [275].

Бацили, завдяки спороутворенню, мають високу стійкість до дії несприятливих факторів зовнішнього середовища і широко поширені в природі. За класифікацією вони відносяться до домену *Bacteria*, типу *Firmicutes*, класу *Bacilli*, ряду *Bacillales*, родині *Bacillaceae*, роду *Bacillus*, виду *B. subtilis*.

Таксономічно рід *Bacillus* належить до типу *Firmicutes* та включає понад 104 видів, які демонструють високу різноманітність [269-271]. Філогенетичний аналіз на основі 16S рРНК і мультилокусного типування послідовностей (MLST) на сьогодні розширили знання щодо еволюції та таксономії даного роду.

Друга назва *B. subtilis* — сінна паличка, тому що вперше накопичувальну культуру даного організму отримали з сінного екстракту. У 1835 р. Христіан Готфрід Еренберг вперше описав цей штам, однак в його інтерпретації цей мікроорганізм називався *Vibrio subtilis*, згодом у 1872 р. *B. subtilis* отримав свою сучасну назву [21].

За сучасними публікаціями вчених (упродовж останніх п'яти років) оновлено 1168 генетичних функцій *B. subtilis*, що дозволило побудувати нову

метаболичну модель цього мікроорганізму, що представляє екологічний і промисловий інтерес. При цьому основний акцент будується на нових метаболических ідеях, ролі металів у метаболізмі та біосинтезі макромолекул, функціях, що беруть участь у формуванні біоплівки та контролі ростових, клітинних процесів [272, 273].

Відомо, що перебуваючи в стані «спокою спор» у бактерій *B. subtilis* значно знижується метаболізм, вони демонструють неймовірну стійкість до хімічних, фізичних агентів (окислення, висушування, ультрафіолетове і гамма-опромінення, вакуум) і патогенності. Бактерії можуть перебувати в такому стані протягом тривалого часу. Спори (незважаючи на інактивацію метаболізму) можуть залишатися здатними до безперервного контролю трофічного режиму середовища, а також швидко реагувати на надходження відповідних поживних речовин, проростаючи і відновлюючи вегетативний ріст. Тому спори, з моменту їх виявлення, були визнані найбільш витривалою формою життя на Землі [20, 22].

Використання штамів *B. subtilis* економічно доцільно, оскільки даний мікроорганізм досить невибагливий в субстраті, що використовується для його біотехнологічного культивування. Найчастіше для його культивування в лабораторних умовах використовують універсальні середовища – м'ясо-пептонний агар (МПА) або бульйон (МПБ), рибні гідролізати, тобто середовища, засновані на використанні мікроорганізмами для забезпечення своїх живильних потреб тваринних білків. Однак основним недоліком поживних середовищ на основі МПБ є невеликі ростові якості для виділення мікроорганізмів та висока вартість вихідної продукції.

Для одержання біомаси *B. subtilis* найчастіше застосовують як лабораторні, так і промислові середовища. В промисловості широко використовують більш дешеві середовища на основі гідролізатів та кукурудзяного екстракту, також застосовують середовища для глибинного культивування, що містять гідролізат казеїну, дріжджовий екстракт, а також дріжджі, вуглеводи та солі.

В якості посівного матеріалу використовують культури *B. subtilis*, які вирощують протягом 24 год. в середовищі оптимізованого складу, що вноситься в кількості не менше 1,0% від об'єму середовища. Культивування здійснюється як мінімум протягом 24 годин при температурі 28-30°C на качалці з частотою обертів 220-240 хв<sup>-1</sup>. Після закінчення культивування отримують культуральне середовище з вмістом клітин не менш ніж 1-3х10<sup>9</sup> кл./мл. [20, 46, 47].

*B. subtilis* – являють собою грампозитивні великі палички з закругленими кінцями (1,0-1,3 × 4,6-5,5 мкм), їх товщина близько 0,7 мкм [23]. Розмноження бактерії відбувається за допомогою поділу, іноді, після поперечного поділу залишаються з'єднаними в тоненькі нитки або ланцюжки з двох або більше клітин.

Бактерії *B. subtilis* здатні до руху, джгутики розташовані перитрихіально. За несприятливих умов середовища утворюють центральну овальну спору, що не перевищує розмір клітини. Мають клітинну стінку грампозитивного типу, за своєю морфологією є паличками, здатні до спороутворення. Формування спор починається на другу добу росту. Під час спороношення асиметрично розташована перегородка ділить клітину *B. subtilis* на більшу материнську клітину, яка згодом просувається вперед, щоб поглинути меншу спору. Після поглинання спора повністю закривається в цитоплазмі материнської клітини, де вона дозріває в процесі, що включає синтез пептидогліканової кори та білкової оболонки. Після дозрівання материнська клітина піддається лізису, вивільняючи спору в навколишнє середовище, де вона залишається в стані спокою, доки не створяться умови, відповідні для проростання.

Морфологія колоній *B. subtilis* сильно варіює, залежно від місця та умов існування. Колір колоній може бути білими, злегка бежевим або рожевим, їм притаманний рівний хвилястий край, мають суху дрібно-зморшкувату структуру [24, 25], рис. 1.2.

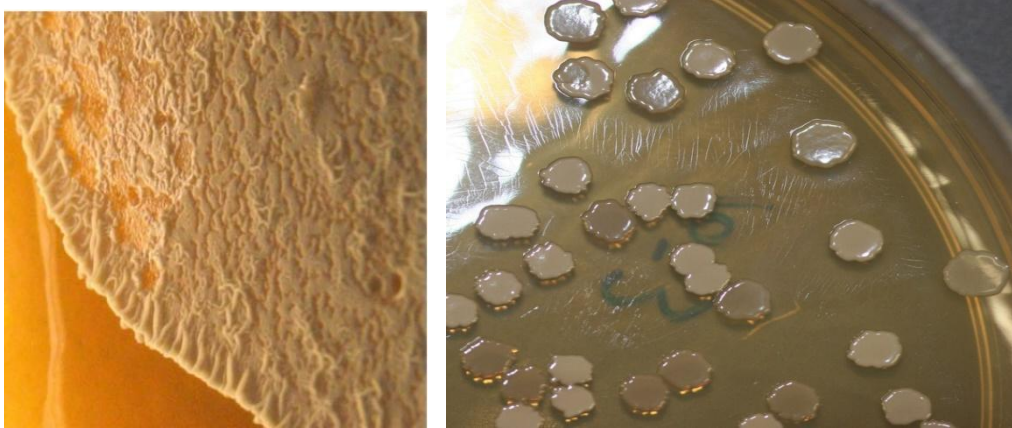


Рисунок 1.2 – Морфологія колоній *B. subtilis* на поживних агаризованих середовищах LB, МПА [240].

*B. subtilis* демонструє безліч морфологічних ознак (фенотипів) — від тонких, плоских мікроструктур до великих, просторово гетерогенних біоплівки колоніального типу [263]. Утворення біоплівки *B. subtilis* на агаризованих щільних середовищах, зокрема на лізогенному бульйоні (LB) продемонстрували дослідження [264]. При цьому утворення біоплівки та формування стійкого фенотипу *B. subtilis* відбувалось за умов додаткової присутності суміші гліцерину та мангану, що сприяло збільшенню продукції позаклітинного матриксу та активної споруляції.

Для вивчення лімітованого росту мікроорганізмів використовують різні способи безперервного культивування, найчастіше хемостатні культури [20].

За результатами досліджень S. Gingichashvili зі співавторами [265] показано, що колоніальне різноманіття, які з'являється після 72 годин культивування *B. subtilis*, за певних лімітуючих факторів середовища (обмеження поживних речовин) значно змінюється як у морфологічних характеристиках, так і у кінетиці росту спороутворюючих мікроорганізмів, рис. 1.3.



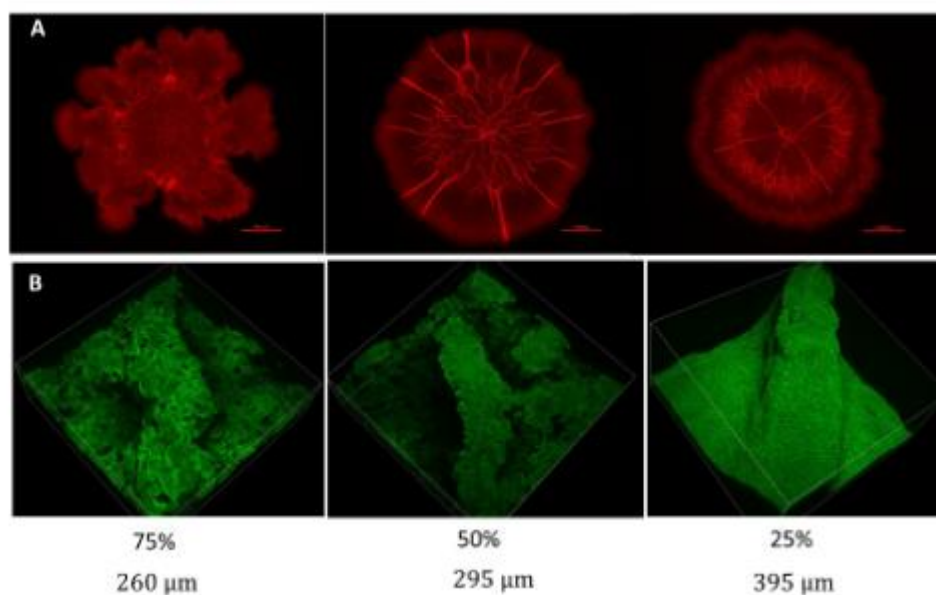


Рисунок 1.3 – Зміни морфології *B. subtilis*: (А) вплив концентрації агару LB на макроколонію *B. subtilis*. Зріла колонія без поживних речовин (верхній рядок, ліворуч), колонія виросла за умов 5,0% забезпечення поживними речовинами (верхній ряд, посередині), за умов 25,0% доступності поживних речовин (верхній ряд, праворуч). Масштабна шкала—5000  $\mu\text{m}$ ; (Б) вплив прогресивної концентрації агару LB на структуру окремого каналу або «зморшки» [265].

За типом живлення бактерії *B. subtilis* відносяться до хемоорганотрофів, оскільки як джерело енергії використовують хімічні сполуки, а для джерела вуглецю — найчастіше органічні речовини. По відношенню до кисню бактерії відносяться до факультативних анаеробів, ростуть тільки в присутність кисню [26]. Беруть участь у процесах амоніфікації, забезпечують мінералізацію органічних сполук азоту, поповнюючи таким чином запаси мінерального азоту в ґрунті.

Сталість ферментативних систем бактерій *B. subtilis* сприяє використанню біохімічних властивостей у поєднанні з їх морфологічними, культуральними та іншими постійними ознаками видового різноманіття (морфотипів, філотипів, серотипів, патотипів та ін.) бактерій. За типами ферментативної активності бактеріальних культур виділяють п'ять груп:

протеолітичні, сахаролітичні, окислювально-відновлювальні, аутолітичні, патогенні. Найбільш дослідженими є сахаролітичні та протеолітичні ферменти [27, 28].

Висунуто припущення про можливість окремих штамів *B. subtilis* ферментувати лактозу, але при цьому залишатися нейтральними щодо глюкози. Крім цього є повідомлення про те, що інші штами можуть зброджувати тільки глюкозу, а найбільш активні біоагенти можуть викликати розщеплення відразу декількох цукрів (глюкоза і лактоза) [29, 30].

Штами *B. subtilis* здатні до гідролізу крохмалю, так само вони можуть розщеплювати глюкозу, сахарозу, маніт, мальтозу і лактозу. Є повідомлення про засвоєння даними бактеріями L-арабінози, мелібіози, рибози, слабкому засвоєнню цитратів, а також практичному не засвоюванні етанолу, D-ксилози. Деякі з них не здатні до руйнування глікогену, але можуть розкласти поліоксіетилени Tween 20, Tween 80.

Галактоза давно znana як компонент клітин *B. subtilis*, проте її точна локалізація та функція в клітині поки ще не з'ясовано [42]. Арабіноза не відома як компонент клітин бацил та взагалі фірмікут. Відомо, що рибоза входить до складу РНК та у ряду представників *B. subtilis* до тейхоєвих кислот, і цілком природно припущення дослідників про її наявність у тій самій ролі у клітинних стінках штамів філогенетично близьких видів. Рамноза для бацил відома лише у складі ендоспор, її наявність у зразках окремих штамів, може свідчити про початок процесу ендоспороутворення у бактерій. Цікавою в цьому контексті є відсутність особливого цукру хіновози, характерного для ендоспор *B. subtilis* та вегетативних форм деяких штамів цього виду [42].

Дані бактерії синтезують практично всі групи ферментів, які необхідні для успішного розщеплення поживних речовин: амілази, ліпази, протеази, пектинази, целюлази. Про високу активність цих ферментів свідчить той факт, що бактерії *B. subtilis* активно використовуються і в харчовий промисловості для ферментативної обробки продуктів.

До теперішнього часу склад жирних кислот бактерій *B. subtilis* добре вивчений, показана його відтворюваність та видоспецифічність. Вченими виявлено, що бацили, як і інші грампозитивні бактерії, містять три групи жирних кислот: з прямим, розгалуженим ланцюгом або складні. У порівнянні з іншими грампозитивними бактеріями (*Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Clostridium*) спорові *B. subtilis* характеризуються відносною гомогенністю жирнокислотного складу [31]. Тому різноманітність жирних кислот, їх специфічний розподіл серед видів бактерій використовують як важливий хемотаксономічний біомаркер у ідентифікації бактерій.

Найбільш детально жирнокислотний склад клітинних ліпідів було досліджено Kaneda T [103]. Зокрема, він сформував основні закономірності жирнокислотних спектрів представників роду *Bacillus*. Так, за вмістом певних жирних кислот у профілях ключові види, що належать до цього роду можна поділити на шість груп (A–F). На його думку вирішальним для такої градації є вміст ненасичених, кількість певних розгалужених кислот та довжина вуглецевого ланцюгу наявних у спектрах жирних кислот. Так, групі E, до якої віднесено види *B. anthracis*, *B. cereus* і *B. thuringiensis* притамана незначна кількість ненасичених жирних кислот (7 - 12%), домінування 13-метил тетрадеканової кислоти (19-31%) серед усіх розгалужених кислот і присутність у жирнокислотних спектрах кислот з 12–17 атомами вуглецю [103, 104], що не суперечить одержаним результатам інших дослідників.

У процесі дихання бактерій *B. subtilis* утворюється перекис водню (клітинна отрута для них). Характерним ферментом для багатьох штамів є каталаза (разом з формуванням перекису вона розщеплює його на воду і молекулярний кисень, тому перекис водню ніколи не досягає високих концентрацій в клітині).

Згідно з даними літератури, поліморфізм штамів *B. subtilis* проявляється у стійкості до антибіотичних речовин, сполук і композицій пеніцилінового ряду ( $\beta$ -лактамних антибіотиків: пеніциліну, карбеніцилін, ампіциліну). Доведено, що спорові бактерії слабостійки до аміноглікозидних антибіотичних речовин,

наприклад стрептоміцину, мономіцину. Штами *B. subtilis* мають стійкість до поліміксину, ріфампіцину, малочутливі до лінкоміцину, стрептоміцину.

Різноманіття метаболічних процесів, гетерогенність культуральних і біохімічних властивостей спорових бактерій *B. subtilis* стали обґрунтуванням використання сучасних молекулярно-біологічних підходів для ідентифікації даного виду. Слід підкреслити, що традиційні дослідження досі мають цінність і затребувані, оскільки фенотипові дослідження необхідні для диференціації функціональних властивостей схожих таксонів.

Представники роду *Bacillus* є домінуючими в ризосфері окремих видів рослин і трапляються у відомих типах ґрунтів усіх кліматичних зон. Так, за підрахунками А.І. Мелентьєва частка азотфіксувальних видів *B. azotofixans*, *B. coagulans*, *B. polymyxa*, *B. macerans* може сягати 18,8% від загальної кількості спороутворюючих бактерій у ґрунті [32].

Різноплановими дослідженнями доведено, що аеробні бацили як пробіотичні компоненти мають ряд переваг над молочнокислими бактеріями: вони володіють більш високим рівнем антагоністичної активності по відношенню до широкого спектру патогенної та умовно патогенної мікробіоти, стійки до несприятливого впливу агресивного середовища, невимогливі до умов зберігання та тривалий період зберігають свою життєздатність і функціональну активність [33].

Наприклад, створений пробіотик Ендоспорин (Інститут мікробіології та вірусології НАН України) на основі штамів *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* УКМ В-5139 і В-5140, який призначений для профілактичних заходів і лікування кишкових інфекцій, дисбактеріозів, гнійних ран, післяпологових ендометритів, затримання посліду у сільськогосподарських тварин [34].

В цілому, бактерії, що належать до роду *Bacillus*, можуть бути перспективними продуцентами біоПАР (поверхнево-активних речовин), оскільки вже відомі деякі штами, наприклад, *B. subtilis* і *B. licheniformis*, що продукують ліпопептидні ПАР сурфактин і ліхенізин. Проте, здатність до утворення біоПАР представниками даного роду вивчена слабо. Встановлено,

що серед представників роду *Bacillus* найбільшим потенціалом утворення біоПАР володіють ізоляти виду *B. subtilis*.

Так, у продуцентів біоПАР – *B. subtilis* (*B. subtilis* ІБ-17, *B. subtilis* ІБ-18 і *B. subtilis* ІБ-19) на середовищі, яке містить крохмаль у дослідженнях [266, 267] показано, що інтенсивне утворення поверхнево-активних речовин здійснюється в логарифмічній фазі росту бактерій, приблизно через 10 годин від початку їх вирощування, і завершується до переходу в стаціонарну фазу. З переходом в стаціонарну фазу (через 24 години) концентрація біоПАР досягає свого максимуму. При припиненні вегетативного росту клітин і переході їх до формування спор подальших змін у величині поверхневого натягу не відбувається. Синтез поверхнево-активних речовин культурами бацил пов'язаний з інтенсивністю катаболічних процесів, що дозволяє, при розробці відповідних технологій, використовувати процеси безперервного культивування продуцентів.

Cooper D.G. et al. [268] запропонували технологію отримання сурфактину за допомогою відомого штаму *B. subtilis* ATCC 21332, засновану на безперервному відборі піни з ферментера. Реалізація даного рішення дозволила досягти виходу сурфактину 0,7-0,8 г/л.

Таким чином, з біологічної погляду дослідження мікробних ПАР дозволяє детальніше зрозуміти таке явище у природі, як активний антагонізм.

Сучасні відомості про первинні метаболіти, такі як амінокислотний та вуглеводний склад, в літературі представлена значно менше і для ряду груп взагалі відсутня, не зважаючи на важливість таких даних як з точки зору цитофізіології, так і потенціалу штамів у якості пробіотика, що актуально зокрема і для бацил [35, 191]. Ці показники характеризують важливі для клітинної фізіології молекули (білки, полісахариди), що робить їх також одним з інструментів поліфазного таксономічного аналізу [40].

Спектри жирних кислот досліджених штамів демонструють риси, які характерні для представників роду *Bacillus* та групи видів *B. subtilis*, зокрема. До даної групи, окрім вищезазначеного, входять такі види, як *Bacillus*

*megaterium*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. amiloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. mojavensis* тощо [35, 41]. Різноманіття штамів даної групи є продуцентами біологічно активних речовин, зокрема антибіотиків та бактеріоцинів.

Різноманітність метаболічних процесів, генетична і біохімічна варіабельність, стійкість до літичних і травних ферментів, послужили обґрунтуванням використання *B. subtilis* в різних галузях сільського господарства, медицини. Управління з контролю за якістю біотехнологічних і лікарських засобів у США, присвоїло бактеріям *B. subtilis* статус GRAS (*generally regarded as safe*) — цілком безпечних організмів, що є обов'язковою умовою для застосування цих бактерій у виробництві препаратів [69].

У кожному конкретному мікробіологічному виробництві є свої специфічні особливості – склад поживних середовищ, способи їх приготування, умови культивування виробничої культури, методи виділення кінцевого продукту. Однак ці особливості не змінюють загальну схему мікробіологічного виробництва.

За вивченістю генетичних та фізіологічних властивостей бактерії *B. subtilis* посідають друге місце після *E. coli*. Про великі перспективи і можливості *B. subtilis* в біотехнології свідчить факт створення банку даних з молекулярної генетики цього штаму (SubtiList), в який вноситься вся інформація про бактеріальний геном [70, 71].

У клітинах бактерій *B. subtilis* найчастіше виявляються позахромосомні генетичні елементи невеликого розміру (до 10 kb) сімейства pC194, що містять гени загального метаболізму, деякі з яких здатні мобілізуватися на перенесення шляхом кон'югації (наприклад, pTA1015, pTA1060, p1414) [155]. У клітинах природних бактерій *B. subtilis* виявлено лише дві кон'югативні плазміни (pLS20 і pBS72), які мають різні системи ініціації реплікації і здатні передаватися з високою частотою в ізогенних системах схрещувань, а також мобілізувати перенесення в клітини гетерологічних бактерій роду *Bacillus* некон'югативні позахромосомні генетичні елементи різних таксономічних груп, що містять mobV-сайт [156, 157].

Інтерес до даних позахромосомних генетичних елементів обумовлений насамперед їх здатністю забезпечувати горизонтальне перенесення генів серед бактерій. природних популяцій. У зв'язку з цим присутність кон'югативних плазмід необхідно враховувати при використанні природних бактерій *B. subtilis* як основу біопрепаратів для практичного використання (наприклад, як стимулятори росту рослин, пробіотиків для тварин).

Для виявлення бактерій, які мають плазмиди, широко використовують метод ПЛР. При цьому є повідомлення, що як матрицю ПЛР успішно використано тотальну ДНК, виділену з ґрунту. В даний час даний методичний прийом широко використовується для характеристики природних мікробних популяцій і дозволяє встановлювати наявність певних таксономічних груп мікроорганізмів (у тому числі для виявлення патогенів), а також окремих генетичних детермінант, присутніх в геномах ґрунтової мікробіоти, що включає також і некультивувані бактерії [46, 158]. Оскільки ґрунти характеризуються різним складом і можуть містити сполуки, що інгібують протікання ПЛР (наприклад, гумінові кислоти), для перевірки чистоти виділеної тотальної ДНК реакцію, як правило, дослідники проводять з декількома праймерами.

Молекулярно-генетичні аналізи і послідовність ДНК показують, що гени біосинтезу антибіотиків бацил кластеризуються в поліцистронні одиниці транскрипції і знаходяться під контролем глобальних регуляторних систем, які керують експресією генів, та індуються, коли клітини бактерій роду *Bacillus* вступають у стаціонарну фазу росту. Біосинтез нерибосомальних пептидів здійснюється мультиензимними комплексами (нерибосомальні пептидсинтетази). Ці комплекси організовані за модульним принципом, послідовність амінокислотних залишків в пептиді, що синтезується, визначається послідовністю амінокислотних залишків самих нерибосомальних пептидсинтез. Ускладнені структури нерибосомальних пептидів запобігають гідролізу антибіотиків протеолітичними ферментами, створюють просторові структури, що дозволяють взаємодіяти з мішенню. Утворення пептидних антибіотиків у споро утворюючих бактерій контролюється азотною і

вуглецевою репресією, зниження синтезу спричиняється зміною рН середовища та утворенням із глюкози оцтової і піровиноградної кислот [118].

Нещодавно за допомогою філогенетичного аналізу було продемонстровано, що комплекс *B. subtilis* може бути організований у чотири субкомплекси [262]. Субкомплекс а (*subtilis*) розходиться на дві основні гілки, що включають близькоспоріднені штами *B. subtilis* і *B. atrophaeus*. Субкомплекс б (*amyloliquefaciens*) поділяється на *B. amyloliquefaciens*, підвид *amyloliquefaciens* і *B. amyloliquifaciens*, підвид *plantarum*, який нещодавно був перейменований на *B. velezensis*. Субкомплекси с і d представлені штамами *B. licheniformis* і *B. pumilus* відповідно.



## 1.2 Фізіологічно активні метаболіти мікроорганізмів

Мікробіом поліфункціональний і виконує стабілізуючу функцію метаболічної рівноваги у природі. В агроєкосистемах мікроорганізми є основним фактором ґрунтоутворювального процесу, живлення рослин і фітосанітарного стану ґрунту. Тому всі заходи, спрямовані на відновлення ґрунтової родючості і підвищення продуктивності, екологічної безпеки агровиробництва, мусять бути пов'язані з діяльністю мікроорганізмів [43-45].

На сьогодні цілісний біологічний підхід є кращою стратегією для ефективного технологічного контролю ґрунтових біологічних ресурсів через комплексну інтеграцію біотехнологічних, хімічних, фізичних підходів і технологій на основі їх управління. Практично весь ґрунтовий біом має природні механізми, здатні обмежувати розвиток фітопатогенних організмів, покращувати продукційний процес у рослин та ін. [46].

Перетворення вуглецевмісних сполук (целюлози, корневих ексудатів) є найбільшим за масштабами природним процесом, головну роль в якому виконують ґрунтові мікроорганізми. Тому глибоке пізнання всіх процесів, що відбуваються в системі «ґрунт – мікроорганізми – рослина» і можливість раціонально управляти ними є основним завданням агромікробіології, біотехнології, ґрунтознавства, екології. У всіх процесах широко використовують прокаріоти (бактерії), що представлені різними таксонами, які пов'язані з видовими особливостями мікробіоти. Пул природних ресурсів прокаріот, в першу чергу бактеріальних продуцентів р. *Bacillus*, завдяки їх різноманіттю і лабільності, має великі перспективи для біотехнології.

Одним з найбільш активних продуцентів метаболітів, що позитивно впливає на рослини, є бактерії *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. brevis*, *B. megaterium* та ін., що сприяють росту рослин завдяки продукуванню фітогормонів, розчиненню неорганічних фосфатів, синтезу органічних кислот, антагонізму до фітопатогенних мікроміцетів та ін.

Мікробні препарати на основі мікроорганізмів р. *Bacillus* окрім

біологічної основи (живих клітин) мають у своєму складі синтезовані мікроорганізмами в процесі життєдіяльності метаболіти. Залежно від діючого компоненту, обробку рослин можуть здійснювати:

- ✓ мікробною біомасою (живі клітини);
- ✓ метаболітами мікроорганізмів (фізіологічно активні речовини);
- ✓ культуральною рідиною (живі клітини + метаболіти).

У залежності від технологічних умов і вимог регламенту виробництва для сільськогосподарської продукції активно застосовують мікробні препарати з різними товарними формами [20, 47]:

- порошкоподібну – у вигляді сипучих речовин, які складаються з дрібних часток розміром до 0,1 мм;
- рідку – у вигляді водної суспензії мікроорганізмів;
- гельну – у вигляді кисельоподібної маси;
- гранульовану – у вигляді дрібних щільних грудочок;
- суху – препарат з показниками вологості менше 10,0%;
- пастоподібну – у вигляді однорідної тістоподібної суміші.

З практичної точки зору, обробку мікробною біомасою доцільніше проводити з метою захисту рослин від фітопатогенних організмів та ураження змішаними хворобами. Метаболіти мікроорганізмів або фізіологічно активні речовини мікробного походження доцільно використовувати з метою регуляції росту і розвитку рослин [48]. За дії бактерій–продуцентів фітогормонів можуть відбуватися зміни ендогенного гормонального балансу рослин [48, 49].

Мікробні вторинні метаболіти (продукти мікробного синтезу, які не є необхідними для росту і розмноження біологічного агента) знаходять практичне використання у різних галузях промисловості: харчовій, хімічній, нафтодобувній, охороні довкілля, сільському господарстві, а також у фармацевтичній галузі та медицині. До таких метаболітів належать антибіотики, екзополісахариди, поверхнево-активні речовини, антивірусні та цитотоксичні агенти, інгібітори ферментів.

Як відомо, вторинні метаболіти являють собою сполуки, що синтезуються

деякими видами мікроорганізмів, і, переважно утворюються після припинення росту у вигляді комплексу подібних сполук. Однак їхня здатність до синтезу часто втрачається в результаті мутацій або в процесі зберігання продуцентів [276]. До вторинних метаболітів належить широкий спектр сполук з різними типами біологічної активності (антимікробна – антибактеріальна, антифунгальна; хіміотерапевтична – протипухлинна (цитотоксична), протівірусна; фармакологічна – інгібітори ферментів, імунологічно активні супресори, модулятори).

Представники родини *Bacillaceae* здатні до синтезу антимікробних сполук (поверхнево-активні речовини, в тому числі ліпопептиди, антимікробні пептиди, екзополісахариди та інші речовини, табл. 1.1.

Відомо, що фітогормони регулюють процеси життєдіяльності рослин, наприклад поділ, розтягнення клітин, що лежать в основі всіх процесів росту і морфогенезу. Вони можуть контролювати рівень ауксинів, цитокінінів та гіберелінів. З дією ауксинів пов'язаний диференційний ріст, поділ і розтягнення клітин, утворення бічних коренів у живців, вони стимулюють поглинання й транспорт поживних речовин по рослині [50, 51].

Здатність до біосинтезу позаклітинних полісахаридів поширена серед мікроорганізмів різних таксономічних груп, можливість і ступінь проявлення якого залежать від умов існування продуцентів [52].

До важливих функцій екзополісахаридів (ЕПС) слід віднести: захисні, прикріплення до поверхні, утворення біоплівки, взаємодія мікроорганізмів з іншими мікро- та макроорганізмами, задоволення трофічних потреб. Фізіологічне значення мікробних ЕПС полягає у створенні і підтримці сприятливих для мікроорганізмів умов існування.

Для різних фітогормонів важливим є їх абсолютна кількість – вирішальний фактор для росту рослини, а також їх співвідношення, що впливає на диференціацію рослинних тканин та органів.

Таблиця 1.1 – Біологічно-активні метаболіти бактерій родини *Bacillaceae*  
[277, 278]

Бактерії	Метаболіти / сфера потенційного застосування	Біологічна активність метаболітів та їх ефективна концентрація (мкг/мл) або зона затримки росту (мм)
1	2	3
Вільноіснуючі		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> PPCB004	Ліпopeптиди: ітурин А, феніцин, сурфактин А / сільське господарство	Антифунгальна (фітопатогени): <i>Alternaria citri</i> (3,1 мкг/мл), <i>Botryosphaeria</i> sp. (1,0 мкг/мл), <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (3,1 мкг/мл), <i>Fusicoccum aromaticum</i> (2,1 мкг/мл), <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (1,0 мкг/мл), <i>Penicillium crustosum</i> (1,0 мкг/мл), <i>Phomopsis persea</i> (1,5 мкг/мл)
<i>Bacillus</i> sp. N	Дикетопіперазини: cyclo-(L-Pro-L- Leu), cyclo-(D-Pro- L-Leu) та cyclo-(D- Pro-L-Tyr) / медицина, фармацевтична промисловість, сільське господарство	Антимікробна: <i>Bacillus subtilis</i> MTCC 2756 (16-32 мкг/мл), <i>Staphylococcus aureus</i> MTCC 902 (16-32 мкг/мл), <i>Escherichia coli</i> MTCC 2622 (16-32 мкг/мл), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC 2642 (16 мкг/мл) Антифунгальна: (збудники хвороб людей) <i>Aspergillus flavus</i> MTCC 183 (16- 64 мкг/мл), <i>Candida albicans</i> MTCC 277 (16-50 мкг/мл); (збудники хвороб рослин) <i>Fusarium oxysporum</i> MTCC 284 (8-32 мкг/мл), <i>Rhizoctonia solani</i> MTCC 4634 (4-8 мкг/мл) та <i>Penicillium expansum</i> MTCC 2006 (4-8 мкг/мл)
Ендофітні		
<i>Bacillus subtilis</i> EDR4	Протеїн: E2 / сільськогос- подарська промисловість	Антифунгальна: (фітопатогени) <i>Fusarium graminearum</i> (125 мм), <i>Macrophoma kuwatsukai</i> (185 мм), <i>Rhizoctonia cerealis</i> (125 мм), <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> (145 мм), <i>Botrytis cinerea</i> (155 мм), <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> (225

		мм)
--	--	-----

Досліджено, що близько 5,0% геному *B. subtilis* дикого типу призначено виключно для синтезу біоактивних сполук [38].

Здатність *Bacillus* spp продукувати сидерофори ще недостатньо вивчена. Є дані, що штам *B. subtilis*, виділений з ризосфери та ідентифікований як продуцент сидерофорів, проявляє інгібіторні властивості щодо фітопатогенних організмів [279]. Повідомляється про опосередковану дію сидерофор *B. subtilis* в аспекті біоаккумуляції кадмію (Cd) як альтернативної стратегії біоремедіації [280].

Летючі метаболіти підвищують ефективність вторинних метаболітів, що продукуються бактеріями в певному середовищі існування. *B. subtilis* виділяє різноманітні леткі вторинні метаболіти, включаючи терпени, азот, сірковмісні сполуки, бензоїни, вуглеводні [281]. Ці метаболіти в основному вважаються клітинними сигнальними молекулами, що опосередковують міжклітинні та внутрішньоклітинні взаємодії [282]. В працях S. Xie, H. Zang зі співавторами повідомляється, що подібні метаболіти бактерій виявляють антифунгальну та антибактеріальну активність [283, 284]. *B. subtilis* вивільняє багато летючих метаболітів, що беруть участь у біогеохімічних циклах і біоконверсії харчового ланцюга та численних метаболічних процесах, таких як нітрифікація та мінералізація азоту (їх середня кількість нараховується близько 14 метаболітів на один штам) [285]. За останніми дослідженнями M. Kai [285] встановлено, що *B. subtilis* виділяє 15,0% кетонів, 14,0% азотовмісних метаболітів, вуглеводнів, ароматичних метаболітів, 11,0% бензоїдів і спиртів, 7,0% органічних кислот, 6,5% альдегідів і складних ефірів та, 0 3% сірки.

Серед екзометаболітів бактерій р. *Bacillus* з рістстимулювальною активністю виявляються фітогормональні сполуки – ауксини, абсцизова кислота. Фітогормональні сполуки, синтезовані мікроорганізмами можуть свідчити про їх позитивну роль у формуванні корисних взаємозв'язків з рослинами, забезпечуючи стимуляцію ростових процесів, стійкість до абіотичних стресів та відігравати важливу роль у захисті рослин від

фітопатогенів, що, в цілому, вважається перспективним прийомом при обробці рослин [53].

Ауксини, як гетерогенна група сигнальної молекули карбонової кислоти, яка відповідає за регуляцію різноманітних фізіологічних процесів рослин, виявлено в культуральній рідині бактерій родів *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *Paenibacillus* тощо [5, 9].

Їх синтез фіксується в надземних частинах (верхівка пагона) і активно транспортується до підземних частин рослин за допомогою двох загальних транспортних шляхів – через флоему до кореня (ненаправлений пасивний шлях) або через клітину до спрямованого активного шляху, який має назву полярний транспорт ауксину [289].

Відомо, що індол-3-оцтова кислота є потужною сигнальною молекулою, необхідною для взаємодії рослин і мікроорганізмів, яка безпосередньо покращує фізіологічні процеси росту і розвитку рослин [290]. У дослідженнях Shameer, Prasad [291] продемонстровано, що види *Bacillus* (*B. cereus* So3II та *B. subtilis* Mt3b) мають потенціал як для стимулювання росту рослин, так і для синтезу ауксину навіть під час стресу в присутності інгібіторних сполук. При цьому спостерігається відгук кореневої системи рослин через виділення ними триптофану безпосередньо у ризосфері (а ризосфера, як відомо, використовується мікроорганізмами як попередник для біосинтезу індол-оцтової кислоти).

Цитокиніни були відкриті Ф. Скугом (США, 1955 р.), а природний цитокинін – зеатин був виділений значно пізніше (Д. Літам, Австралія, 1964 р.) [54]. Мікроорганізми здатні синтезувати кінетин, зеатин, ізопентиладенін та їх похідні, які мають різну хімічну будову і, відповідно, фізіологічна активність їх варіює [55].

Цитокиніни синтезуються ризобактеріями, які належать до різних родів і деякими стрептоміцетами. Здатність продукувати цитокиніни виявлена у багатьох рістстимулюючих бактерій, зокрема у родів *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Paenibacillus* [56].

Цитокініни важливі для індукції клітинних поділів, регуляції різних процесів розвитку, включаючи ембріогенез, підтримку апікальної меристеми пагонів і коренів, формування бічних органів пагонів (ініціації росту й утворення коренів), перериванні періоду спокою насіння, уповільненні старіння листя, збільшення тривалості періоду цвітіння [57].

В багатьох публікаціях показано, що гібереліни є найпоширенішим класом гормонів, виявлених у мікроорганізмів: *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter nimipressuralis* [58], *B. pumilus*, *B. licheniformis* [59], *Achromobacter xylosoxidans*, *Gluconobacter diazotrophicus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhizobia ssp.*, *Azotobacter spp.*, *Bacillus spp.*, *Herbaspirillum seropedicae* і *Azospirillum spp.* [60] і за останніми даними метилотрофні бактерії *Methylobacillus* також здатні до синтезу ГКЗ.

Гібереліни регулюють ріст стеблової частини рослин, збільшення кількості міжвузлів, індукцію цвітіння, стимулюють процеси проростання насіння та стійкості до абіотичних стресів. Для багатьох рослин деякі фітогормони (гібереліни, цитокініни) можуть бути індукторами або стимуляторами цвітіння. Послідовна участь фітогормонів необхідна для нормального формування насіння і плодів.

Таким чином, позитивні ефекти застосування метаболітів, як екзополісахариди (ЕПС) і фітогормони можуть бути пов'язані з стимуляцією росту та розвитку рослин, а також здатністю вивільняти поживні речовини за рахунок продукування позаклітинних ферментів. До того ж, метаболіти, що продукуються мікроорганізмами (саліцилова кислота, етилен, глутамат, ауксини та інші), тісно пов'язані з формуванням стійкості рослин до хвороб [1, 2, 20].

Ґрунтові мікроорганізми здатні синтезувати і катаболізувати індол-оцтову кислоту, використовуючи її як єдине джерело вуглецю, азоту та енергії, тим самим мінімізують негативні наслідки високих концентрацій речовин, які продукуються патогенними бактеріями (прояв механізму захисту рослин від фітопатогенів).

Вважається, що здатність до синтезу гормонів – одна з основних властивостей ризосферних, епіфітних, ендofітних і симбіотичних бактерій, що стимулюють ріст рослин. Тому дослідження фітостимулювальної, антагоністичної активностей бацил при створенні мікробних препаратів широкого спектру дії для рослинництва є досить актуальним.

За кількістю продукції антибіотичних речовин види роду *Bacillus* є другими мікроорганізмами після стрептоміцетів [118, 119]. Основні продуценти антибіотиків цього роду: *B. brevis* (наприклад, граміцидин, тиротрицин), *Bacillus cereus* (наприклад, церексин), *Bacillus laterosporus* (латероспорин), *Bacillus licheniformis* (бацитрацин), *Bacillus polymyxa* (поліміксин, колістин), *Bacillus subtilis* (бацитрацин, мікобацилін, субтілін).



### **1.3 Механізми біологічної активності *Bacillus subtilis* та спектр дії фізіологічно активних сполук в ризосфері культурних рослин (взаємодія з рослинами)**

Широкий спектр біологічно активних речовин (білки, вітаміни, фітогормони, екзополісахариди, низькомолекулярні сполуки — органічні кислоти, амінокислоти) розглядають як основні складові при дослідженнях механізму дії ґрунтових мікроорганізмів в екоценозах. Відомо, що амінокислоти як компоненти біологічних систем відіграють важливу роль в процесах метаболізму і їх регуляції. Вторинні метаболіти важливі для регулювання процесів клітинної диференціації, а також обмеження розвитку конкуруючих бактерій [61]. А фітогормони та їх сполуки (аксини, цитокініни, гібереліни, абсцизова кислота, етилен та ін.) контролюють та здійснюють регуляцію життєво важливих процесів у рослинному організмі практично на всіх етапах онтогенезу.

У літературних джерелах зустрічаються повідомлення про ґрунтові мікроорганізми, які здатні синтезувати і катаболізувати індол-оцтову кислоту (ІОК), використовуючи її як єдине джерело вуглецю (С), азоту (N) і енергії, тим самим мінімізуючи негативні наслідки високих концентрацій ІОК, які продукуються патогенними бактеріями (один із механізмів захисту рослин від фітопатогенних організмів) [62].

Встановлено, що цитокініни разом з ауксинами діють комплексно на поділ корових клітин кореня рослин, можуть слугувати медіаторами змін його клітинної стінки, пов'язаних з утворенням інфекційної нитки всередині деформованого кореневого волоска і наступним проникненням бактерій у кору кореня. Крім того, цитокініни можуть підсилювати транспорт органічних і неорганічних речовин. Таким чином, у одних органах відбувається гальмування ростових процесів, в інших — активація.

Доведено, що інокуляція ґрунтовими бактеріями, які продукують абсцизову кислоту сприяє запуску комплексу антиоксидантних захисних

реакцій, покращує надходження поживних елементів, підвищує стресостійкість та продуктивність рослин [1].

Для нормального росту і розвитку рослин важливий метаболіт етилен, який відіграє важливу роль у регуляції (утворення або обмеження) симбіотичних структур (азотфіксуючих бульбочок, ендомікориз) та може розглядатись як антистресовий гормон [63]. Бактерії, що продукують фермент 1-аміноциклопропан-1-карбоксилат (АЦК) деаміназу, сприяють росту рослин у різних стресових ситуаціях.

PGPR мікроорганізми (ризосферні бактерії) можуть стимулювати ріст рослин безпосередньо за допомогою різних механізмів, в тому числі за допомогою продукування фітогормонів, солюбілізації фосфору і регулюванням емісії етилену [1, 20]. Вони також здатні побічно стимулювати розвиток рослин шляхом пригнічення патогенних організмів завдяки запуску низки механізмів, в тому числі конкуренції за поживний субстрат корневих ексудатів, секвестр  $\text{Fe}^{3+}$  сидерофорів, продукуванню антибіотичних речовин і індукції системного захисту у фітобіоті. Індукція системної стійкості у рослин і продукування антибіотичних речовин, наприклад феназин і флороглюцину, лежить в основі ключових механізмів біологічного контролю, пов'язаного з бактеріями. Гідролітичні ферменти, що продукуються деякими PGPR бактеріями, можуть лізувати стінки клітин грибів, і тим самим запобігати проліферації фітопатогенів.

Отже, ризосферні бактерії можуть виступати «модераторами» формування рослинно-грунтових систем. Наведені факти підкреслюють потенціал ризобактерій, що володіють рядом функціональних можливостей, які допомагають визначати і контролювати велику кількість фізичних і хімічних ґрунтових процесів і біологічних взаємодій, що мають важливе значення для функціонування екосистем.

У низці наукових робіт було показано, що важливим моментом формування мікробних ризосферних систем крім кількісних значень, є їх функціональна спрямованість [1, 170, 175]. Саме остання дає можливість

зрозуміти роль ризосферних рослинних субстратів у формуванні взаємодії та трофічних циклів з мікробіотою в ґрунті. Що стосується рослин і продукування корневих ексудатів – це процес виділення розчинних сполук в результаті дифузії. Коріння рослин продукують органічні кислоти та інші речовини з метою поліпшення поживного режиму, наприклад мобілізації фосфору і активації заліза.

Останні наукові публікації призводять до висновків, що кореневі ексудати є важливими базовими компонентами основних частин поживних трофічних мереж ґрунтів і самого процесу ґрунтоутворення. Кореневі ексудати зумовлюють регуляцію різних позитивних і негативних рослинно-мікробних взаємодій.

З наукових джерел відомо, що коренева система впливає та змінює середовище ґрунту, формує в ній потужний склад мікробного біому та структуру угруповань, що своєю чергою, крім трофічного забезпечення рослини дає високий рівень захисту через стимуляцію метаболічної активності від збудників хвороб. Багато антагоністичних мікроорганізмів природно наявні в ґрунті та мають змогу за певних умов виявляти високий ступінь біоконтролю, незалежно від діяльності людини. Отже, рослини в ризосфері впродовж онтогенезу модифікують хімічну і фізичну структури ґрунту, а також видовий склад мікрофлори та її текстуру.

Рівень впливу ризосфери рослин на текстуру мікробних угруповань має певну диференціацію залежно від біотичних взаємодій, оскільки він може бути тривалим, пролонгованим (довшим, ніж термін життя цих організмів). Отже, коренева система рослин є природним екологічним інжинірингом, а рослини взаємодіють з певними складовими мікробних угруповань ґрунту для захисту від інфекцій та патогенів.

Коренева система рослин здатна за рахунок ексудації забезпечувати середовище ризосфери значною кількістю фотосинтезованого вуглецю та ініціювати оптимізацію метаболізму, взаємодію з ґрунтовою мікробіотою. При цьому рослини продукують сигнальні речовини, що розпізнаються

ризосферними мікроорганізмами, які своєю чергою, завдяки цьому сигналінгу колонізують поверхню коренів. Хемотаксис ґрунтових мікроорганізмів було широко досліджено та вивчено на патогенних і симбіотично асоційованих з рослинами бактеріях.

Дослідженнями Shrestha et al. [241] показано, що адгезія та утворення ґрунтовими бактеріями біоплівки на поверхнях рослин разом з продукцією антимікробних метаболітів може забезпечити їм конкурентні переваги перед фітопатогенними мікроорганізмами та сприяти стимулюванню росту рослин, поліпшенню контакту коріння з ґрунтом. Вивчення здатності бактерій до формування біоплівок на рослинах може дозволити відібрати перспективні штами для використання їх в сільському господарстві.

Бактеризація ґрунтовими мікроорганізмами позитивно впливає на біометричні показники рослин (висоту, довжину рослин, формування кореневої системи) та суху біомасу [241, 242]. Зниження ефективності інокуляції за завчасного застосування ґрунтових мікроорганізмів можна компенсувати за рахунок використання комплексу органічних речовин (наприклад, полісахаридно-білкового комплексу як матриці стабільності), який підвищує життєздатність клітин мікроорганізмів у стані спокою.

Продовжується активна праця науковців щодо поглиблення знань про закономірності просторової, таксономічної і функціональної структури рослинно-мікробних угруповань кореневої зони рослин та процеси, які лежать в основі рослинно-мікробних взаємодій [243], а також збору сучасних моніторингових даних про мікробний біом ґрунту, комплексні роботи з аналітичної селекції штамів ґрунтових мікроорганізмів.

Для раціонального використання потенціалу регуляторних (сигнальних) рослинно-мікробних взаємодій необхідно звертати увагу не лише на ефективність нових штамів та їх сумісність, але й знати, за яких умов штам-інокулянти можуть успішно конкурувати з представниками ґрунтових популяцій специфічних бактерій та колонізувати кореневу систему рослин.

Необхідно враховувати, що швидкість еволюції геномів мікросимбіонтів

перевищує швидкість еволюції рослин, а отже, рослину слід розглядати як найбільш генетично стабільний у часі, ключовий компонент, що контролює ефективність функціонування рослинно-мікробних систем [244].

У літературі накопичена певна кількість інформації щодо приживаності мікроорганізмів в ризосфері сільськогосподарських рослин. Так, бактерії роду *Bacillus* здатні адаптуватися та ефективно функціонувати у ризосфері зернових, овочевих культур [1, 107, 236, ]. Серед накопичених відомостей відмічається, що чисельність антибіотикорезистентних штамів може поступово знижуватись після інокуляцій них заходів (наприклад, від декількох мільйонів до кількох десятків колоній наприкінці вегетації рослин).

Мікробіологічна регуляція ростових процесів є дієвим засобом підвищення стійкості культурних рослин до несприятливих факторів середовища та підвищення продуктивності сільськогосподарських культур за рахунок мобілізації потенційних можливостей рослинного організму [222].

*Bacillus* spp. на молекулярному та фенотипічному рівнях може взаємодіяти з іншими мікроорганізмами ризосфери (або їхніми метаболітами) через шляхи модуляції виробництва вторинних метаболітів (циклічних ліпопептидів або полікетидів). Деякі процеси розвитку, такі як утворення біоплівки, рухливість і спороутворення, також можуть бути змінені при взаємодії, що відображає адаптацію багатоклітинних угруповань *Bacillus* до мікробних конкурентів для збереження їх екологічної стійкості. Вказується на обмежений характер подібних досліджень, необхідність додаткових знань для розуміння екології бацил у природній ґрунтовій ніші, а також для оцінки потенціалу у перспективному напрямку біологічного контролю [245]. Все ще залишаються незрозумілими молекулярні механізми, що об'єднують сприйняття екзогенних тригерів з регуляторною реакцією, а також виробництво біологічно активних вторинних метаболітів.

В цілому, регуляція росту рослин за участю мікроорганізмів включає три механізми: рістстимуляція, поглинання поживних речовин і антагонізм [250]. Як відомо, прямі механізми забезпечення безпосереднього стимулювання росту

рослин включають: фіксацію азоту, фосфатмобілізацію, синтез ауксинів, цитокінінів, гіберелінів, сідерофори, АЦК-деамінази тощо [251].

Щодо непрямих механізмів, слід відзначити наявні відомості про обмеження функціонування фітопатогенних мікроорганізмів в результаті синтезу антибіотиків, сідерофорів, токсинів, літичних ферментів, активації системної індукованої резистентності [252, 253].

За опублікованими даними вчених ризосферні бактерії, ізольовані з рослин *Triticum aestivum* L. мають здатність розчиняти фосфати і покращувати їх ріст [246]. Порівняльні дослідження демонструють фосфатазну активність клітин *B.subtilis* 5 і *B.megaterium* 12 (за оптимальних для функціонування фермента температури 55°C) і pH 9,5-10,0 фосфатазна активність *B.subtilis* 5 становить 260 мкмоль/г субстрату за годину, а *B.megaterium* 12 – 100 мкмоль/г субстрату за годину. Крім цього, повідомляється, що фосфатазна активність цих бактерій активується катіонами  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  та інгібується катіонами  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , а також аніонами ортофосфату ( $PO_4^{3-}$ ) [255].

У останніх публікаціях ряду вчених повідомляється про те, що PGPR мають здатність фіксувати азот для кращого росту пшениці. Встановлено, що ризосферні бактерії мають потенціал для фіксації азоту в умовах сольового стресу, а також стійкість до дефіциту вологи [247, 248].

Доведено вплив бактеризації стресованного насіння ячменю нанокмпозитним комплексним бактеріальним препаратом Азогран (на основі бактерій *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 і *Bacillus subtilis* IMB B-7023) на ріст і розвиток рослин ячменю. В роботі Е. Улзійжаргал [249] показана ефективна протекторна роль нанокмпозитного комплексного бактеріального препарату Азогран в агроєкосистемі ячменю, що корелює з раніше встановленим стимулюючим ефектом біопрепарату на ріст і розвиток інших злаків. Це вказує на перспективність використання *B. subtilis* на інші перспективні об'єкти рослинництва в умовах оксидативного стресу.

Штами *B. subtilis* природного типу у технологіях вирощування пшениці здатні стимулювати ростові процеси, нівелюючи в такий спосіб негативний

вплив патогенів на ростові параметри рослин. Під впливом біоагентів прискорюється проходження рослинами ранніх, більш вразливих для збудників хвороб, фаз онтогенезу, що також підвищує їхню стійкість проти хвороб [254].

Збільшення чисельності агрономічно корисних бактерій в епіфітному мікробіомі насіння за рахунок передпосівної інокуляції *B. subtilis* сприяє кращому розвитку зернових і зерно-бобових культур, покращує лабораторну та польову схожість інокульованого насіння. Бактерії також можуть покращити рослинний метаболізм, виробляючи позаклітинні летючі речовини [256]. Наприклад, *B. subtilis* GB03 виділяє летючі метаболіти, які в довгостроковій перспективі стимулюють ріст, ефективність фотосинтезу, накопичення заліза і призводять до більшого врожаю насіння в *Arabidopsis thaliana* [257, 258].

Згідно з проведеними дослідженнями [259], перспективними щодо стимуляції росту та захисту рослин від патогенів є штами роду *Bacillus*, виділені з незвичних біотопів – з донних відкладень Чорного моря. Геном штаму *B. velezensis* ONU 553 було детально проаналізовано та виявлено здатність цього мікроорганізму до синтезу цілого спектру поверхнево-активних речовин, ліпопептидів, сидерофорів, антимікотиків та антибіотиків (перспектива у подальших дослідженнях щодо мікробно-рослинної взаємодії).

Основними способами позитивного впливу на рослини вважаються: триптофан-залежний синтез фітогормону ІОК; летючі речовини, які включаються у біохімічні цикли рослини (наприклад, 2,3-бутандіол та ацетон); синтез ферменту фітази, що дозволяє отримувати розчинну форму фосфатів, доступну для рослин; фіксація азоту та секреція макромолекул, що руйнують певні ферменти [260, 261].

За останніми даними важливим механізмом позитивної взаємодії бактерій відмічається саме стимуляція індукованої системи резистентності, що запускає ланцюг захисних реакцій проти фітопатогенних організмів та допомагає рослині переносити несприятливі умови оточуючого середовища.

На сьогодні актуальним питанням для дослідників залишається встановлення молекулярних механізмів пригнічення та перешкоджання

активного росту мікроміцетів (антифунгальна активність летких метаболітів бактерій, яка може бути пов'язана з явищем руйнування клітин). Існує припущення, що за рахунок індукції проникності мембран у спорах мікроміцет відбувається зменшення транспорту іонів калію в клітину [286]. Для того, щоб компенсувати цей дисбаланс, активується протонний шлях, щоб збільшити потік іонів водню в клітину та підтримувати сумарний заряд по обидва боки мембрани. Це, ймовірно, викликає швидку зміну рН всередині клітини, і порушує фізіологію клітини, що призводить до загибелі. Кілька досліджень підкреслюють здатність летких метаболітів переривати градієнти рН між позаклітинним і внутрішньоклітинним середовищем [287, 288].

Таким чином, біологічно активні метаболіти, які продукуються ґрунтовими мікроорганізмами, у т.ч. *B. subtilis*, є стійкою основою для розвитку виду, який перспективний у використанні в агрономії, харчовій та фармацевтичній промисловості. Тим не менш, виділення та очищення цих метаболітів є основною проблемою, і, крім того, ізольовані вихідні продукти та їх пряме застосування може виявитися нежиттєздатними.



#### 1.4 Перспективи використання мікроорганізмів *Bacillus subtilis* як агентів мікробних препаратів для рослинництва, землеробства

Значення ґрунтових мікроорганізмів в оптимізації технологій вирощування сільськогосподарських культур важко переоцінити, оскільки існування рослин без участі мікроорганізмів неможливе. Мікробні перетворення поживних речовин є ключовим фактором росту і розвитку рослин, що сприяє збільшенню продуктивності екосистем. Окрім забезпечення біогенними елементами, складовими, що впливають на ріст та розвиток рослини, існує здатність бактерій продукувати фізіологічно активні речовини, які регулюють цілу низку процесів життєдіяльності рослин.

Природою закладені всі механізми управління найважливішими біосферними процесами: азотфіксація, фосфатмобілізація, антагонізм мікроорганізмів до фітопатогенів, синтез багатьма ґрунтовими мікроорганізмами біологічно активних речовин, здатних суттєво впливати на фізіологічний стан рослин і їх імунітет, викликати епізоотії у шкідників сільськогосподарських культур тощо. Активізація рослинно-мікробної взаємодії є потужним фактором підвищення продуктивності агроценозу, хоча в сільськогосподарській практиці використовується недостатньо. Тому необхідна широкомасштабна біологізація агротехнологій вирощування культур для забезпечення умов реалізації природних процесів.

На даний час вченими-дослідниками розроблено цілісні методології створення поліфункціональних біопрепаратів для фітосанітарної оптимізації агроценозів на основі штамів *B. subtilis* з високою комплексною біологічною активністю за колом ознак: фунгіцидною, бактеріцидною, антивірусною, фіторегуляторною, крім цього, технологічних і екологічно безпечних для теплокровних тварин і людини [68].

На сьогодні науково доведена можливість реалізації агроекологічних біотехнологій контролю за фітопатогенами. Наприклад, використано мультикритеріальний підхід, пов'язаний із розробкою формування у ризосфері

рослинно-мікробних систем на фоні оптимізації санітарно-гігієнічних властивостей ґрунту. Спочатку створюють штучний комплексний інфекційний фон із патогенних мікроорганізмів (ґрунтових міксоміцетів), а потім використовують мікробні агенти й стратегії та методи їх застосування (рис. 1.4). Такий науковий підхід свідчить про можливість комбінованого застосування інноваційних розробок з функціональними особливостями біологічних систем завдяки агроекологічному методичному обґрунтуванню [46].

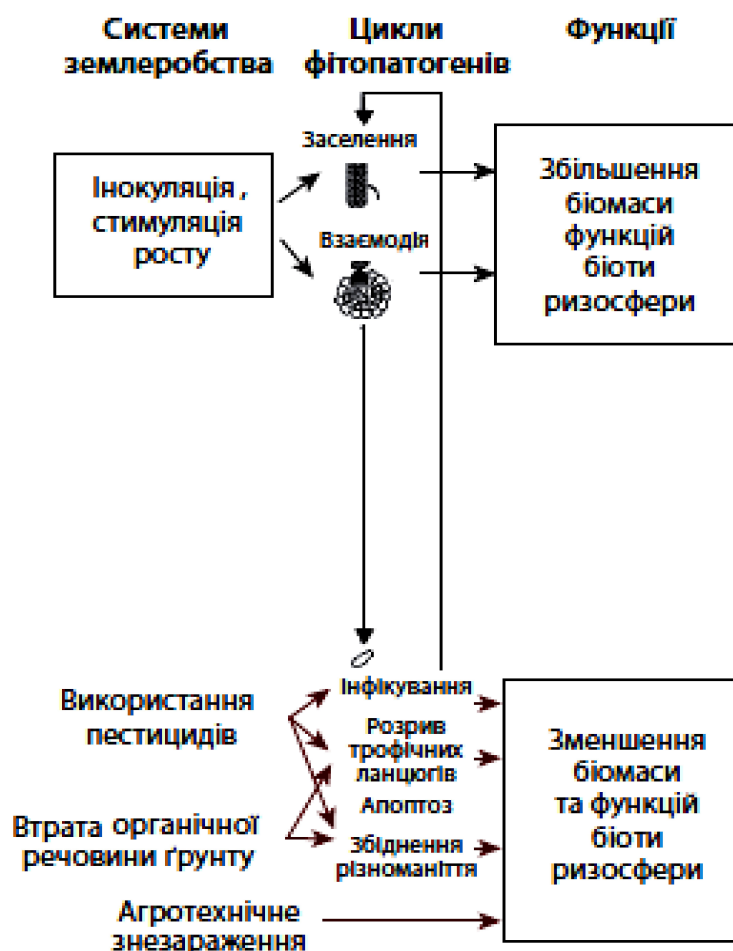


Рисунок 1.4 – Біотехнологічні аспекти використання природних функцій мікробних агентів у сучасній системі захисту рослин (методи ведення сільського господарства визначаються відповідно з системами землеробства з урахуванням біологічних циклів фітопатогенів) [46].

На відміну від мікроміцетів, бактерії роду *Bacillus*, у переважній більшості, непатогенні, стабільні при збереженні, технологічні у виробництві,

що у поєднанні з високою гідролітичною активністю робить їх перспективними для створення біопрепаратів для деструкції поживних решток та ін. [101, 102].

Мікробні препарати є комплексним фактором впливу на розвиток рослин, і не останнє значення в цьому відіграють фітогормони та інші біологічно активні сполуки бактеріального походження, які в значних кількостях містяться в біодобривах. Фізіологічно активні речовини здійснюють суттєвий вплив на підвищення коефіцієнтів використання добрив рослинами. Відомо, що засвоєння мінерального азоту з добрив не перевищує 50%, фосфору (навіть з найкращого добрива-суперфосфату) – 20 % і калію – 25-65% залежно від типу ґрунту. Решта вимивається з дощем і попадає у водойми, забруднює продукцію, закріплюється в ґрунті у випадку фосфорних добрив тощо.

Корисні мікроорганізми, заселивши кореневу систему, певний час створює захисний фон (не допускають патогенів) щодо інфікування рослин. Дослідженнями встановлено, що навіть насіння, зібране з бактеризованих рослин, є значно менш зараженим збудниками різних хвороб, особливо міксоміцетами-фітопатогенами [20, 64]. За рахунок фізіологічно активних речовин, що містяться в біопрепаратах, значно покращуються також посівні якості насіннєвого матеріалу – зростає енергія проростання і схожість насіння. Особливо це актуально, коли висівається некондиційне насіння.

За літературними даними, найбільша кількість бактерій як в ризосфері, так і в ризоплані виявляється в фазі цвітіння рослин. Найменша ж кількість відповідає стадії дозрівання. Такий характер сукцесії пов'язаний із заміною бактерій, які живляться продуктами екзоосмосу рослин (еккрісотрофами), на гідролітиків, що розкладають кореневої опад, стару рослинну масу, коріння, мікробну біомасу. іншою причиною зміни складу бактеріальних угруповань в процесі вегетації рослин є зміна складу корневих виділень рослин, що слугують поживним джерелом для бактерій.

Мікроорганізми утворюють біоплівку, що формується на кореневій

системі і виконує багато життєво важливих функцій для рослин, зокрема забезпечує захист рослин від фітопатогенних мікроорганізмів. Крім того, утворення біоплівки на кореневих волосках значно покращує контакт коріння з ґрунтом, підвищуючи поглинання біогенних речовин, що сприяє покращенню живлення рослин [65].

Одним із стратегічних напрямів сучасного землеробства є розкриття його адаптаційного потенціалу – використання інноваційних біологічних засобів відтворення родючості ґрунту та отримання екологічно безпечної продукції рослинництва. Серед таких засобів, що застосовуються в агротехнологіях вирощування сільськогосподарських культур, важливу роль відіграють мікробні агенти поліфункціональної дії для забезпечення трофічної структури метаболізму біологічних систем в ризосфері рослин, біопротекторної дії, індукції системної стійкості рослин від патогенів і фітофагів [64].

Біотехнологічні (мікробні) препарати мають низьку собівартість, технологічні, нешкідливі для людини та навколишнього середовища. Є всі підстави стверджувати, що потреба в мікробних препаратах землеудобрювальної, рістстимулювальної, поліфункціональної дії буде зростати з року в рік, зважаючи як на великі площі сільськогосподарських угідь в Україні, так і на тенденції застосування біопрепаратів у сільському господарстві інших країн.

Перспективним напрямом розвитку сучасної агробіотехнології є створення функціональних препаратів на основі консорціумів мікроорганізмів, які здатні інтенсивніше та за менш короткі періоди оздоровлювати ґрунт та підживлювати рослини. Крім того сукупна діяльність мікроорганізмів консорціуму дозволяє довести до повної мінералізації будь-які органічні сполуки, що далеко не завжди може зробити популяція одного виду мікроорганізму. Це досягається за рахунок того, що в консорціумі мікроорганізмів генний пул, який відповідає за метаболізм, на кілька порядків різноманітніше, ніж у окремих видів [66, 67].

Новий напрямок у програмах розробки мікробних препаратів на основі бактерій-антагоністів — це комплексні препаративні форми, що включають кілька штамів-продуцентів, що синтезують різні за складом метаболітні комплекси, що істотно розширює спектр їх дії. До числа таких біотехнологічних мікробних засобів захисту рослин від хвороб відноситься препарат «Вітаплан СП», що містить клітини штамів *B. subtilis* ВКМ В-2604D і *B. subtilis* ВКМ В-2605D. Штамм *B. subtilis* ВКМ В-2604D синтезує антибіотики різної будови (поліпептидний антибіотик з групи бактеріюцинів і полієновий антибіотик), а штам *B. subtilis* ВКМ В-2605D утворює поліпептид, близький до бациліну, і гексаєнові антибіотики, один з яких віднесено до підгрупи медіоцидіна [72]. Штам *B. subtilis* ППМ-15, який є продуцентом препарату «Бактофіт» («Бацифіт») для захисту від борошнистої роси огірків, вертицильозному вілту бавовнику, кореневих гнилей овочевих та зернових культур [73]. Штам *B. subtilis* N 10 володіє високою антагоністичною активністю щодо широкого спектру збудників мікозів рослин і є продуцентом біопрепарату «Алірін Б».

Відомо препарати – пробіотики на основі штамів *B. subtilis*: Бактисубтіл, Споробактерін, Біоспорин, Бактиспорін, Субалін та ін. [74-76]. Повідомляється, що методом скринінгу відібрано активні штами *B. subtilis* з комплексом властивостей для позитивного впливу на ріст і розвиток овочевих (*Cucurbita pepo* L.). Так, у фазі цвітіння виявлено максимальний рівень адгезивної активності бацил, зумовленої високими показниками частоти формування генів адгезії *tar* A, *eps* A, а також продукція фітогормону гіберелинової кислоти, що стимулює ріст рослин ( $8,43 \pm 0,2$  мкг/мл) [77]. Виявляється при цьому, що найбільш висока концентрація абсцизової кислоти ( $2,26 \pm 0,2$  мкг/мл), яка гальмує ріст рослин, спостерігалася у бацил, які виділялися (відбіралися) у фазі плодоношення *C. pepo* L.

Зміни видового і кількісного складу мікроорганізмів в ризосфері та ризоплані в процесі розвитку рослини відзначено на прикладі різних культур [1, 169, 170].

На природному явищі антагонізму мікроорганізмів по відношенню до фітопатогенів заснований мікробіологічний метод захисту рослин від хвороб, який є одним з найбільш перспективних в зв'язку з його ефективністю і екологічністю. Ризосферні штами *B. subtilis* в усі фази вегетаційного розвитку культурних рослин можуть характеризуватися антагоністичною активністю щодо фітопатогенів, наприклад збудників плямистості гарбузових культур *Pectobacterium carotovora* subsp. *Carotovora*, а також *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, що викликає м'яку гниль гарбузових [78].

Високий ступінь антифунгальної активності бактерій роду *Bacillus* виявлена щодо широкого спектру фітопатогенних грибів: *Alternaria alternate*, *A. solani*, *A. brassicicola*, *Aspergillus flavus*, *A. unguis*, *Botryosphaeria ribis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Drechlera oryzae*, *Emericellopsis glabra*, *Fusarium oxysporum*, *F. roseum*, *Helminthosporium maydis*, *Phomopsis gossypii*, *Puccinia graminis*, *Penicillium lividum*, *Rhizopus oryzae*, *Septoria ribis*, *Sporotrichum pruinosum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium* spp. [6, 12].

Встановлений факт прояву штамами *B. subtilis* IMB B-7516 та *B. licheniformis* IMB B-7515 антагоністичної активності щодо фітопатогенних бактерій [102]. Використання їх композиції, в якості біопрепарату для утилізації пожнивних залишків, дозволяє не лише зменшити на полях кількість целюлозовмісних субстратів, а й ареал існування фітопатогенів та безпосередньо впливати на видовий і кількісний склад останніх. Порівняно зі штамами *Trichoderma* spp. та *C. globosum*, бацилярна культура більш стійка до несприятливих умов навколишнього середовища, що надає їй переваги у застосуванні.

Бактерії роду *Bacillus* відомі здатністю солюбілізувати фосфор з важкорозчинних неорганічних фосфатів та мінералізувати органічні сполуки фосфору. Фітати становлять до 60,0–80,0% від загального фосфору в рослинах та до 50,0% від органічного фосфору ґрунтів. В той же час фосфор фітатів є недоступним для рослин, а дефіцит доступного фосфору є однією з основних

проблем сільськогосподарського виробництва. Представники роду *Bacillus* можуть синтезувати фосфатази як широкого спектру дії, так і вузькоспецифічні фітази, які каталізують гідроліз фітатів. Вітчизняні вчені активно досліджують ростову та фітазну активності бактерій *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023, які слугують базовим компонентом комплексного бактеріального препарату для рослинництва Азогран. Такі результати досліджень розширюють розуміння впливу *B. subtilis* ІМВ В-7023 на фосфорне живлення та розвиток рослин [154].

Таким чином, застосування мікробних препаратів у технологіях вирощування різних сільськогосподарських культур сприяє оптимізації живлення та забезпечує їхній захист від фітопатогенних організмів, що дозволяє значною мірою реалізувати потенціал аграрного виробництва.

Для виробничих потреб штами *B. subtilis* замовляють зі спеціалізованих колекцій. У світовій практиці накопиченням, зберіганням і розповсюдженням відомостей про культури мікроорганізмів займаються більш ніж в 60 країнах, з яких 19 держав є учасниками Будапештського Договору про міжнародне визнання депонування мікроорганізмів. Багато колекцій мають статус міжнародних організацій, наприклад, CNCM (Франція), CCAP, CMCC, ECACC, NCIB, NCTC, NCYC (Великобританія), DCSM (Німеччина), NCAIM (Угорщина), JFO (Японія), CBS (Нідерланди), ARS (NRR), ATCC, IVI (США) [90]. У більшості з перерахованих колекцій є фонд штамів *B. subtilis*, який покликаний забезпечити потреби виробників мікробних препаратів. При цьому необхідно враховувати, що для того, щоб препарати на основі бактерій довгий час зберігали свою активність і конкурентоспроможність, необхідна постійна ротація штамів. У зв'язку з цим, накопичення і розвиток власних колекційних фондів мікроорганізмів є пріоритетним напрямком для багатьох спеціалізованих наукових установ.

## Висновки до розділу 1

Аналіз літературних джерел показав, що використання корисних ґрунтових, ризосферних мікроорганізмів як основи мікробних препаратів для аграрних технологій є актуальним питанням сучасності. Тому функціонування перспективних штамів бактерій роду *Bacillus* (*B. subtilis*) в системі «ґрунт-рослина» і, в цілому, існування наукових підходів щодо корекції мікробіому ризосфери культурних рослин, покращення їх ростових та функціональних показників розвитку, підвищення продуктивності сільськогосподарських культур є необхідним для розвитку аграрного сектору України.

Узагальнено наукові підходи вчених щодо визначення поліфункціональної дії мікробних агентів з метою забезпечення трофічної структури метаболізму біологічних систем в ризосфері рослин, біопротекторної дії, індукції системної стійкості рослин від фітопатогенних організмів. Визначено, що біологічні властивості спорових ризосферних бактерій *B. subtilis* та їх біологічно активних метаболітів (продуцентів мікробних препаратів для рослинництва, землеробства) мають наукову цінність та перспективу через призму рослинно-мікробних взаємодій. Саме комплексні та системні дослідження різних механізмів рослинно-мікробної взаємодії пов'язують з оптимізаційними факторами надходження поживних речовин у рослини, антагонізм до інших мікроорганізмів, особливо патогенних, синтез регуляторів росту або посилення вторинних метаболічних шляхів, які безпосередньо пов'язані з підвищенням стресостійкості рослин.

Численні дослідження вчених дозволили встановити, що застосовування біопрепаратів на основі *B. subtilis* під зерновими (пшениця озима, пшениця яра, ячмінь) ефективно демонструє антагонізм проти патогенів, сприяє активізації схожості, збільшенню надземної біомаси і кореневої системи культур на фоні зараження ґрунтів фітопатогенами. А різноманітність метаболічних процесів, генетична і біохімічна варіабельність, стійкість до літичних і травних ферментів, допомогли обґрунтувати широке використання *B. subtilis* в різних



галузях сільського господарства, медицини. Важливо, що дослідження фітостимулювальної, антагоністичної активностей бацил при створенні мікробних препаратів широкого спектру дії для агрономії є досить актуальним напрямом. Тому для раціонального використання потенціалу регуляторних (сигнальних) рослинно-мікробних взаємодій необхідно звертати увагу як на ефективність нових штамів, їх сумісність, так і умови для активності інокуляційних культур, які здатні успішно конкурувати з представниками ґрунтового мікробіому та колонізувати кореневу систему рослин. Отже, активізація рослинно-мікробної взаємодії є потужним фактором підвищення продуктивності агроценозів, оптимізації живлення культурних рослин та їх захисту від фітопатогенних організмів, що дозволяє максимально реалізувати потенціал аграрного виробництва.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальна частина роботи, яка представлена в розділах 3–6, виконана у період 2019-2023 рр. на базі кафедри ґрунтознавства та охорони ґрунтів імені професора М.К. Шикuli Національного університету біоресурсів і природокористування України. Допоміжна база – відокремлений підрозділ НУБіП України «Агрономічна дослідна станція».

Для роботи з ґрунтовими та рослинними зразками, ізолятами мікроорганізмів дотримувались стандартів і вимог роботи у мікробіологічній лабораторії та норм поводження з біологічними об'єктами, правил безпеки праці [81-83].

При організації та проведенні наукових досліджень у мікробіологічній лабораторії дотримувались державних санітарних правил безпеки роботи з мікроорганізмами (ДСП 9.9.5.035-99), затверджених МОЗ України, а також стандартних правил роботи, які забезпечують стерильність в роботі і попереджують можливість контамінації. Особлива увага приділялась знанням про морфологічні, біохімічні, фізіологічні особливості штамів спорових бактерій, умови їх культивування, що необхідно для отримання чистого та якісного матеріалу.

#### 2.1 Об'єкти дослідження

В межах об'єкту дослідження вивчено властивості нових штамів *B. subtilis* Н3, Н10, Н13, Н36, Н38, Н40, Н43, Н45 та особливості їх розвитку і функціонування в ризосфері пшениці озимої.

Виділення ізолятів бактерій роду *Bacillus* здійснювали з ґрунтових, ризосферних зразків пшениці озимої (колекційні польові посіви культури на дослідних ділянках кафедри селекції, генетики та насінництва НУБіП України, ВП НДГ «Агрономічна дослідна станція», де представлено 100 різних сортів вітчизняної селекції) елективним методом на поживних середовищах Луріа-

Бертані (LB) та глюкозо-пептонному агарі, ГПА [24, 87].

Період пробопідготовки та відбору зразків для мікробіологічного аналізу – весняна та літня вегетація пшениці озимої (травень, червень 2019-2020 рр., наприкінці цвітіння та початку наливу зерен пшениці (фаза трубкування – вихід у трубку; фаза колосіння).

В роботі використано штами непатогенних ґрунтових мікроорганізмів аграрного призначення із колекції кафедри фітопатології імені академіка В.Ф. Пересипкіна НУБіП України (штам *B. subtilis* 8a, виділений із зерна пшениці озимої сорту Нота Одеська), а також штам *B. subtilis* IMB В-7516 з колекції відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, IMB НАН України).

Як тест-культури використані фітопатогенні мікроміцети родів *Fusarium* (*Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2), *Alternaria* (*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45), надані також з колекції кафедри фітопатології ім. В.Ф. Пересипкіна НУБіП України та фітопатогени р. *Bipolaris* (*Bipolaris sorokiniana*), *Gaeumannomyces*, *Pythium* – збудники кореневих гнилей зернових культур (гнилі проростків, опік проростків, коренева гниль, гниль основи стебла, гниль міжвузля, надлом стебла та інше); бактерії роду *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* – збудники бактеріозів зернобобових культур.

В роботі використовували штами з колекції відділу фітопатогенних бактерій IMB НАН України, а саме: *P. syringae* pv. *syringae* 8511, *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400, *Pectobacterium carotovorum* 8982, *Xanthomonas campestris* 80036.

Тип ґрунту — чорнозем типовий (малогумусний крупнопилуватий середньосуглинкового гранулометричного складу на лесовидному суглинку), найбільш поширений в умовах Правобережного Лісостепу України та Київської області.

Агрономічно цінні ґрунтові мікроорганізми (нові ізоляти) виділяли із ризосферних зразків 20 сортів пшениці озимої, табл. 2.1, 2.2 та рис. 2.1, зокрема:

- сорти Миронівського інституту пшениці ім. В.М. Ремесла НААН України: Міп Валенсія, рік реєстрації — 2017; Міп Дніпрянка, рік реєстрації — 2018; Трудівниця Миронівська, рік реєстрації — 2017; Миронівська Слава, рік реєстрації — 2017.
- Селекційно-генетичного інституту НААН України: Ветеран, рік реєстрації — 2014; Гарантія Одеська, рік реєстрації — 2015; Манера Одеська, рік реєстрації — 2019; Нива Одеська, рік реєстрації — 2014; Традиція Одеська, рік реєстрації — 2014; Лайнер (пшениця тверда), рік реєстрації — 2017; Прозорий, (пшениця тверда), рік реєстрації — 2014; Шляхетний (пшениця тверда), рік реєстрації — 2017.

Таблиця 2.1 – Досліджені сорти пшениці (ВП НУБіП України НДГ «Агрономічна дослідна станція», 2019 р.)

№ з/п	Сорти пшениці	
	Фаза трубкування	Фаза колосіння-наливу зерна
1	2	3
1.	Муза Білоцерківська	Шляхетна
2.	Намисто	Поліська 90
3.	Щедрівка Київська	Муза Білоцерківська
4.	Миронівська Слава	Щедрівка Київська
5.	Аналог	Легенда Білоцерківська
6.	Гарантія Одеська	Лісова пісня
7.	Трудівниця Миронівська	Аналог
8.	Міп Дніпрянка	Прозорий
9.	Міп Валенсія	Здоба Київська
10.	Прозорий	Миронівська Слава
11.	Поліська 90	Лайнер

продовження табл. 2.1

12.	Здоба Київська	Намисто
13.	Традиція Одеська	Традиція Одеська

14.	Манера Одеська	Нива Одеська
15.	Легенда Білоцерківська	Ветеран
16.	Лайнер	Гарантія Одеська
17.	Лісова пісня	Манера Одеська
18.	Ветеран	Міп Валенсія
19.	Нива Одеська	Міп Дніпрянка
20.		Трудівниця Миронівська

- Національного наукового центру «Інститут землеробства Національної академії аграрних наук України»: Намисто, рік реєстрації — 2018; Щедрівка Київська, рік реєстрації — 2016; Поліська 90 (еталон), рік реєстрації — 1994; Аналог, рік реєстрації — 2008.
- Білоцерківської дослідно-селекційної станції Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України: Легенда Білоцерківська, рік реєстрації — 2017; Лісова пісня, рік реєстрації — 2008; Муза Білоцерківська, рік реєстрації — 2018.
- Інституту фізіології рослин і генетики Національної академії наук України: Здоба київська, рік реєстрації — 2014.

Таблиця 2.2 – Нові ізоляти та джерела виділення спорових бактерій р. *Bacillus*, які використано для мікробіологічних досліджень (2019-2020 рр.)

Номер аксенічних культур (ізолятів)	Сортова приналежність культури пшениці озимої	Джерело виділення ізоляту	Примітка: симптоми ураженого рослинного матеріалу
1	2	3	4
Н3	Намисто	ризосфера кореневої системи	Буро-коричневі плями на листках у нижній частині стебла

продовження табл. 2.2

Н5	Щедрівка Київська	філоплана (поверхня) кореневої системи	Нижня частина листків з ржаво-бурими плямами
Н9, Н9а	Гарантія Одеська	чорнозем типовий, профіль до 40 см	Коричневі плями на кінчиках листків

H10	Трудівниця Миронівська	чорнозем типовий, профіль до 40 см; ризосфера кореневої системи	Буро-коричневі плями внизу стебла
H11	Міп Дніпрянка	ризосфера кореневої системи	Буро-коричневі плями на листку
H13	Міп Валенсія		
H16, H17	Поліська 90	ризосфера кореневої системи	Буро-коричневі та світло- коричневі плями на нижньому листі з ознаками хлорозу
H19	Здоба Київська	чорнозем типовий, ризосфера кореневої системи	Їржаво-бурі поздовжні плями на листках внизу
H20	Традиція Одеська	філоплана (поверхня) кореневої системи	Їржаво-буре листя
H21, H22	Манера Одеська	ризосфера кореневої системи	Буро-коричнева пляма листку, бурий кінчик листка
P23, H24	Легенда Білоцерківська	чорнозем типовий; ризосфера кореневої системи	Їржаво-буре листя
H26	Лайнер	ризосфера кореневої системи	Світло-коричнева пляма на світло-зеленому листі
H28	Лісова пісня	ризосфера кореневої системи	Темно-коричнева пляма на листку
H33, H34, H34a	Поліська 90	ризосфера кореневої системи	Буре листя в нижній частині рослин
H36	Щедрівка Київська	чорнозем типовий, профіль до 40 см; ризосфера кореневої системи	Буро-коричнева пляма на нижньому листі
H38	Легенда Білоцерківська	філоплана (поверхня) кореневої системи	Буре листя
H40, H41, H41 <sup>1</sup> , H42	Аналог	ризосфера кореневої системи	Темні плями на стеблі, буро-коричневі плями на листку
H44	Здоба Київська	чорнозем типовий, профіль до 40 см	Бурі плями на листку
H45	Лайнер	філоплана (поверхня) кореневої системи	Буре листя
H51	Валенсія	ризосфера кореневої системи	Коричнева пляма на листку



Рисунок 2.1 — Відбір ґрунтових, ризосферних зразків з колекційних посівів пшениці озимої вітчизняної селекції (ВП НДГ «Агрономічна дослідна станція», дата польових відборів: 16.05.2020 р.; 18.06.2020 р.)

## 2.2 Методи дослідження

В роботі використано комплекс класичних і сучасних методів досліджень: мікробіологічні, біотехнологічні, фізіолого-біохімічні, інструментальні методи і прийоми, методи статистичної обробки даних. Використані методики спрямовано на максимально продуктивне виявлення ефективних мікробних агентів поліфункціональної дії для аграрного виробництва, науково обґрунтованої характеристики біологічних властивостей спорових ризосферних бактерій *B. subtilis*.

*Для проведення мікробіологічних досліджень* здійснено відбір та підготовку зразків ґрунту (чорнозем типовий) з дотриманням стандартних вимог пробопідготовки та зберігання проб у лабораторних умовах, згідно з

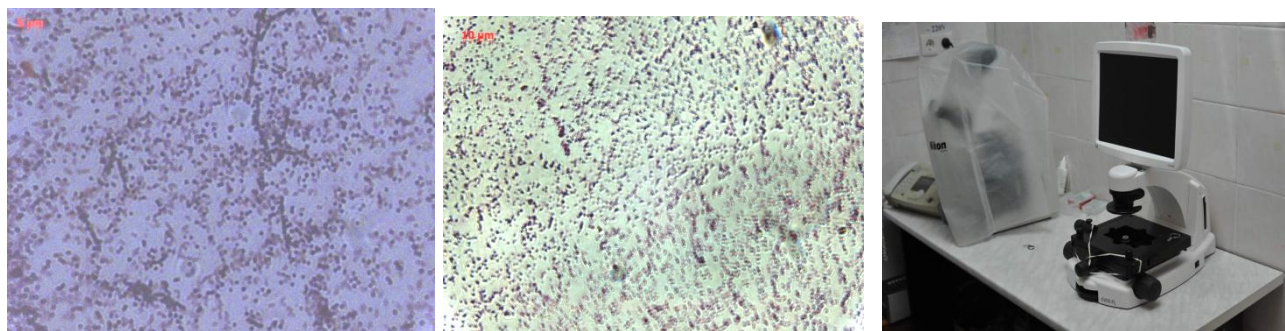
ДСТУ 4287:2004 [105]. Ґрунтові проби досліджувались в чотириразовій повторності.

Зразки ризосферного ґрунту відбирали з коріння після їх ретельного струшування, у динаміці в основні фази органогенезу пшениці: виходу в трубку, колосіння, початку цвітіння та молочної стиглості, повторність трьохразова.

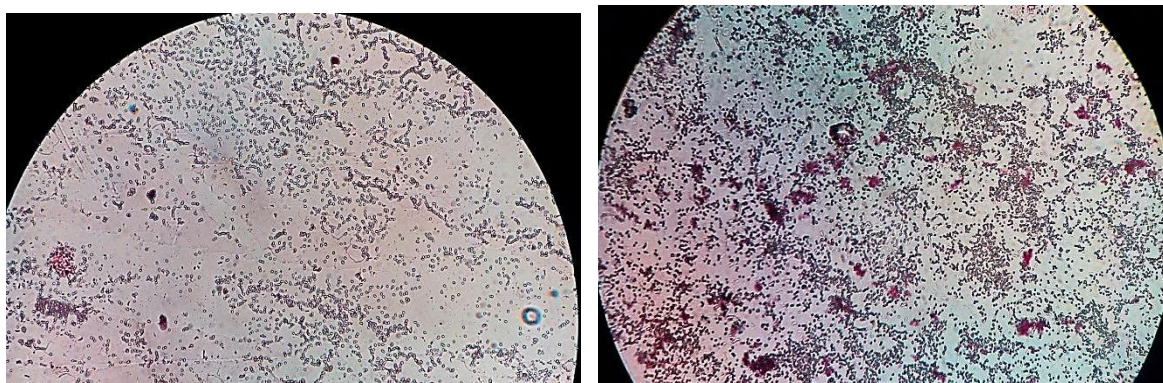
Схема скринінгу ґрунтових мікроорганізмів в експериментальному блоці:

- отримання накопичувальної культури (суспензії аксенічних культур спорових мікроорганізмів, культуральної рідини, популяції колоній) [24, 183].
- мікробіологічний розсів, поверхнєве або глибинне культивування бактерій загальноприйнятими методами у мікробіології, біотехнології [84, 20] – м'ясо пептонний агар, МПА; картопляний агар, КА, глюкозо-пептонний агар, ГПА у модифікації Звягінцева, середовище LB; температура культивування 35°C, термін 72 години;
- відбір чистих (аксенічних) культур із вирослих колоній мікроорганізмів, мікроскопія живих або фіксованих препаратів (забарвлення фуксином), камера Горяєва [24, 84], світлова мікроскопія (апаратне забезпечення — Sigeta MB-130 (×40, ×100), China; цифрова безокулярна система візуалізації клітин EVOS FL Imaging System, Thermo Fisher Scientific, USA), рис. 2.2. Аналіз мікробних колоній здійснювали за принципом визначення груп культуральних ознак, морфотипів, використовуючи інструментальні методи мікроскопії (збільшення ×100).





А)



Б)

Рисунок 2.2 — Лабораторна візуалізація дослідних штамів *B. subtilis*:

А) у системі візуалізації клітин EVOS FL; Б) світлова мікроскопія (x100)

Камера Горяєва являє собою спеціальне предметне скло з нанесеними на ньому поперечними прорізами, що утворюють три поперечно розташовані плоскі майданчики. Середній майданчик розділений ще на дві площадки поздовжнім прорізом, кожна з яких має вигравіровану сітку з квадратами певної площі. По обидва боки середньої площадки в камері Горяєва розташовані дві інших на 0,1 мм вище середньої. Площини цих майданчиків служать для притирання покривного скла до появи так званих Ньютонівських кілець. Мікроскопічний зразок розміщують таким чином, щоб була видна нанесена на камеру сітка і клітини дослідного ізоляту-мікроорганізму, рівномірно розподілені на ній. Після чого визначають число клітин в 1 мл досліджуваної суспензії за формулою (2.1):

$$M = \frac{Ax400}{1000}, \text{ млрд./мл} \quad (2.1)$$

де,  $M$  – титр КУО, відповідні розведення -5, -6, -7 -9, тобто  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  ...  $10^{-9}$ ;  
 $A$  – середнє значення клітин ґрунтових мікроорганізмів у камері горяєва ( $\frac{5}{16}$ ).

З отриманого першого розведення ( $10^{-2}$ ) з дотриманням правил асептики готують ряд послідовних десятикратних розведень (до  $10^{-9}$ ). Для приготування кожного розведення використовують окремі стерильні піпетки, суспензію ретельно перемішують до однорідності. Для аналізу, як правило, використовують розведення  $10^{-7}$ – $10^{-9}$ . Для підрахунку кількості життєздатних клітин використовують в роботі ті чашки Петрі, в яких кількість колоній не менше 30,0 та не більше 200 (за методикою Д.Г. Звягінцева) [24].

Кількість життєздатних клітин або титр спор в 1 мл культуральної рідини (суспензії, препарату) визначали за формулою (2.2):

$$C = \frac{A \times P}{m \times V} \quad (2.2)$$

де,  $A$  – середнє арифметичне число колоній, що вирости в чашках Петрі в конкретному розведенні;

$P$  – коефіцієнт розведення препарату;

$V$  – кількість проби, що обрана для посіву,  $\text{см}^3$ ;

$m$  – вага проби,  $\text{мл}$  (г).

За кінцевий результат прийнято середнє арифметичне результатів двох паралельних визначень, припустиме розходження між якими не повинно перевищувати 30,0%.

Чисельність ґрунтових мікроорганізмів розраховували за формулою (2.3):

$$N = \frac{N_0 \times 10^n}{V} \times K_w, \quad (2.3)$$

де,  $N$  – кількість клітин популяції в 1 г;

$N_0$  – кількість колоній мікроорганізмів на поживному середовищі;

$N$  – ступінь розведення;  $V$  – об'єм мікробної суспензії;

$K_w$  – коефіцієнт вологості зразку.

Вологість ґрунту визначали гравіметричним методом згідно ДСТУ ISO 11465, за відповідними розрахунковими формулами (2.4):

$$W = \frac{P_1 - P_2 \times 100}{P_2 - P}, \quad (2.4)$$

де,  $W$  – вологість, %;  $P$  – маса бюкси, г;

$P_1$  – маса ґрунту разом з бюксом до висушування;

$P_2$  – маса ґрунту разом з бюксом після висушування.

Для визначення кількості клітин мікроорганізмів спектрофотометричним методом впродовж культивування відбирали проби по 1,5 мл [159]. Для кожної проби суспензійних культур була визначена кількість клітин мікроорганізмів за допомогою вимірювання оптичної густини. Для цього проби досліджуваних мікроорганізмів центрифугували впродовж 20 хвилин при 10000 г та температурі 14°C. Після центрифугування для наступної фази експерименту відібрали надосадову рідину, а осаджену масу клітин ресуспендували в стерильному фізіологічному розчині [160]. Оптичну густину отриманих проб суспензій було автоматично встановлено з використанням спектрофотометру «μQuant» виробництва BioTek Instruments (США). Для цього в 96-лункові планшети для кожного досліджуваного штаму розлили проби надосадової рідини та виміряли їх оптичну густину при довжині хвилі 540 нм. Для кожної культури розраховували середнє арифметичне відповідно до кожної доби культивування. Показники, що отримали після вимірювання, перерахували у кількість КУО в 1 мл поживного середовища як показник накопичення мікробної біомаси за допомогою калібрувальної кривої, що відповідає цим мікроорганізмам.

Ізоляти ґрунтових мікроорганізмів розсіювали мікробіологічним шляхом на скошене агаризоване середовище у пробірки для подальших аналізів та зберігання в холодильнику. При виконанні всіх мікробіологічних процедур дотримувалися правила роботи в стерильних умовах.

Визначення морфотипів бактеріальних спорових ізолятів та їх основних фізіологічних та біохімічних властивостей [20, 98, 184].

Аналіз бактеріальних ізолятів р. *Bacillus* проведено за допомогою прямих мікроскопічних методів. Виділення спорових бактерій здійснено шляхом

глибинного висіву суспензій (послідовні розведення до  $10^{-7}$  та  $10^{-8}$ ) у 1,0-1,5% агаризовані поживні середовища LB, МПА, КА, табл. 2.3 [24].

Здатність мікроорганізмів до спороутворення перевіряли прогріваючи суспензії клітин на водяній бані при температурі  $100^{\circ}\text{C}$  протягом 10, 20 та 30 хвилин.

Після трьох днів інкубації культур мікроорганізмів в термостаті при температурі  $28-32^{\circ}\text{C}$  подібні колонії за морфологією бацилярних форм відбирали та пересівали класичним мікробіологічним методом штрихів та Streak Plate Method ( <https://vlab.amrita.edu/?sub=3&brch=73&sim=213&cnt=1> ).

При вивченні видового складу неспорових бактерій використовували поживне середовище наступного складу: 1 л капустиного відвару (100 г капусти на 1 л води), 25 мл пивного сусла, 1,25 мл кукурузного екстракту, рН середовища 7,0-7,2 [107].

Накопичувальні культури містять виключно і переважно клітини одного виду. Їх використовували для дослідження морфологічних, фізіологічних і біологічних властивостей чистих культур бактерій *B. subtilis*. Відомо, що метод накопичувальних культур введений у практику мікробіологічних досліджень С.М. Виноградським і М. Беєринком.

Чисельність ґрунтових мікроорганізмів визначали методом посіву суспензій на відповідні поживні середовища за класичними методиками [24, 30, 84]: м'ясо-пептонний агар (МПА) для обліку мікроорганізмів, які використовують органічні форми азоту; крохмало-аміачний агар (КАА) – для мікроорганізмів, що засвоюють переважно азот мінеральних сполук; олігонітрофільні мікроорганізми на середовищі Ешбі; середовище Чапека і сусло-агар (СА)– для обліку мікроміцетів; целюлозоруйнуючі мікроорганізми – на середовищі Гетчінсона; крім того, враховувались бактерії, що ростуть на агаризованій ґрунтовій витяжці (ГА).

Ступінь домінування мікроорганізмів за показником вище 10,0 % визначали морфологічно.

Визначення загальної мікробної біомаси в ґрунті здійснено регідратаційним методом [185].

Таблиця 2.3 – Поживні середовища для культивування чистих (аксенічних) культур р. *Bacillus*

Компонент середовища	Кількість сухої речовини, г
1	2
<i>Середовище Лурія – Бертани, LB</i>	
Пептон (триптон) / гідролізат казеїну	10,0
Дріжджовий екстракт	5,0
Натрію хлорид	10,0
Агар-агар	15,0-20,0
Вода дистильована	до 1,0 л
pH / стерілізація в автоклаві	7,0-7,3 / 20 хв., при 1,5 атм.
<i>м'ясо пептонний агар, МПА</i>	
м'ясний бульон	до 1,0 л
агар	25,0
натрію хлорид	5,0
pH / стерілізація в автоклаві	7,0-7,2 / 20 хв., 1,5 атм. (120°C)
<i>картопляний агар, КА</i>	
фільтрат картопляного відвару	200 г шматочків картоплі, до 1 л води, довести до кипіння 40 хв.
агар	20,0
pH / стерілізація в автоклаві	7,0-7,3 / 30 хв., при 1,0 атм.
після стерілізації – лимонна кислота	0,1-0,05 мл на 10 мл рідини (чашки Петрі)

Інтенсивність «дихання» ґрунту визначали за виділенням CO<sub>2</sub> і поглинанням O<sub>2</sub> манометричним методом на апараті Варбурга.

Технологічний та фізіологічний стан аксенічної культури контролювали на різних поживних середовищах за умов глибинної ферментації (0,5-1,0-

літрові скляні колби Ерленмейєра) на біотехнологічній терморегулюючій платформі з орбітальним рухом робочої зони 220 об./хв. і температурним діапазоном росту бактерій  $28-30\pm 1^{\circ}\text{C}$  не менше 36 годин [83, 87]. Зміни морфологічних ознак спороутворюючої культури визначали шляхом мікроскопіювання.

Біотехнологічне культивування ґрунтових мікроорганізмів здійснювали на м'ясо-пептонному середовищі (МПА), глюкозо-пептонному агарі (ГПА) у модифікації Звягінцева (г/л): глюкоза – 1; пептон – 1; дріжджовий екстракт – 1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1; агар – 20,  $\text{H}_2\text{O}$  (водопровідна).

Культивування спорових бактерій *B. subtilis* здійснювали глибинно у періодичній культурі в 0,5-1,0-літрових скляних колбах Ерленмейєра на мікробіологічних терморегулюючих платформах при частоті орбітального руху робочої зони 220 об./хв. і температурі  $28-30\pm 1^{\circ}\text{C}$  протягом 72 годин.

Нові штами спороутворюючих бактерій ідентифікували за диференційними ознаками, використовуючи визначник *Bergey* [92].

Для дослідження антагоністичних властивостей штамів *B. subtilis*, ізольованих з ризосфери пшениці озимої, використовувався стандартний метод перпендикулярних штрихів (відстрочені посіви) [47, 88].

Для визначення антагоністичної активності штами-антагоністи рискою за сівали на поверхню агару та через добу, після інкубації за температури  $37^{\circ}\text{C}$ , перпендикулярно до нього на відстані не більше 1–2 мм рисками підсівали тест-культури. За контроль обрано поживне середовище без інокуляції ізолятами мікроорганізмів.

Культивування штамів–антагоністів здійснено на картопляному середовищі в чашках Петрі у термостаті за температури  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ , протягом 72 годин, а тест-мікроміцетів – відповідно на універсальних поживних середовищах глюкозо-пептонний агар (ГПА) та середовище Чапека [47, 88].

Антагоністичну активність враховували за зонами затримки росту тест-культур: 0 мм – культура вважається не активною, до 10 мм – слабоактивна, 11–20 мм – середньо активна, більше 20 мм – високоактивна.



Для визначення антифунгальної активності штамів *B. subtilis* у чашку Петрі з середовищем МПА штрихом наносили штам-антагоніст, після інкубації в термостаті за 37°C упродовж 24–48 годин перпендикулярно до нього на відстані у колі вносили тест-культури мікроміцетів. Культури інкубували упродовж 10 діб за температури 28°C. Контрольними варіантами слугували чисті культури мікроміцетів, які культивували окремо.

Рівень антагоністичної активності ризосферних штамів *B. subtilis* оцінювали за ступенем інгібування росту та розвитку тестових мікроміцетів. Діаметр колонії вимірювали на 14-ту добу, визначали відсоток інгібування росту колоній тест-гриба за формулою (2.5) [47, 89]:

$$\text{Інгібування росту (\%)} = \frac{Дк - Дд}{Дк} \times 100 \% \quad (2.5)$$

де, Дк – діаметр колонії мікроміцета в мм у контролі, Дд – діаметр колонії мікроміцета в мм у досліді.

Штамами з підвищеною антагоністичною активністю вважаються ті, дія яких пригнічує лінійний ріст тест-мікроміцету та становить понад третину порівняно з чистим контрольним варіантом. Діаметр колонії вимірювали у радіально протилежних сторонах двічі, та розраховували середнє арифметичне значення. Ступінь антагоністичної активності дослідного штаму бактерій *B. subtilis* визначався відповідно до розміру зони пригнічення росту тест-штаму навколо агарового блоку. Зони затримки росту враховували через 3 і 10 діб культивування.

**Фізіолого-біохімічні дослідження** проведено за комплексом диференційно-діагностичних тестів, зокрема за продукуванням ацетилметилкарбінолу (АМК), гідролізом крохмалю. За традиційними методиками проводили визначення протеолітичної активності (протеоліз на м'ясо-пептонній желатині, МПЖ), продуктів утилізації білків і пептонів – індолу та сірководню, редукції нітратів до нітритів, здатність до утворення гідролітичних ферментів, асиміляцію органічних джерел вуглецю (згідно з методичними рекомендаціями [84, 186].

Оксидазну та каталазну активність визначали за методами, описаними в [163, 187-189], в умовах кімнатної температури. Ізоляти мікроорганізмів вважалися оксидазонегативними, якщо колір бактеріальної маси при тестуванні не змінювався. Крім цього, відсутність газоутворення чи поява поодиноких бульбашків газу через тривалий час після постановки реакції приймалася як негативна тест-реакція.

Накопичувальні культури використовували для дослідження морфологічних, фізіологічних і біохімічних властивостей чистих культур ґрунтових бактерій. В роботі використано тест-системи API для спорових мікроорганізмів р. *Bacillus* (20A, 50CHB).

Інокульовані бактеріальною суспензією API смуги інкубували при 28°C упродовж 24 годин. Результати аналізували відповідно до інструкції виробника та за допомогою бази даних, включеної в програмне забезпечення APILAB Plus (BioMérieux, Франція).

Для відновлення та підтримання росту тест-мікроорганізмів було використано поживне середовище МПА. Культивування проводилося в термостаті та тривало 3 доби при температурі 37°C [161].

Перевірку антибіотичної активності екзаметаболітів, що синтезуються досліджуваними штамми, було проведено за допомогою методу лунок в агарі [162]. Зразки супернатанту були отримані шляхом центрифугування при 10000 об./хв впродовж 10 хвилин за температури 14°C. В чашки Петрі діаметром 9,0 см розливали по 15-25 мл стерильного розплавленого щільного поживного середовища МПА. Методом «газону» на застигле середовище інокулювали тест-мікроорганізми в асептичних умовах. Лунки діаметром 5,0 мм пробивали асептично стерильним пробійним свердлом, і в лунку вводили зразки надосадової рідини, отримані при культивуванні досліджуваних штамів, об'ємом 0,2 мл. Чашки Петрі з тест-мікроорганізмами було проінкубовано в термостаті при 37°C впродовж 2 діб. Під час інкубації кожену добу вимірювали зону відсутності росту тест-мікроорганізмів навколо лунок. Для оцінки рівню інгібування величину зони затримки росту (діаметр у мм), тобто відсутність



росту тест-штамів, розраховували як середнє арифметичне трьох вимірів проєкцій, що були обрані випадково [161]. Для кожного варіанту досліджуваних штамів було зроблено 5 повторень.

Резистентність штамів *B. subtilis* до антибіотиків: тетрацикліну, стрептоміцину, левоміцитину, канаміцину, рифампіцину, еритроміцину, оксациліну, амоксациліну, ампіциліну визначали з використанням тестових паперових дисків, просочених відповідними антибіотиками [82, 88, 163].

У модельних дослідженнях проводили визначення оптимального навантаження бактерій *B. subtilis* на насінні пшениці в лабораторних умовах. Бактеріальні інокулянти у вигляді суспензії культур *B. subtilis* використовували як у формі вегетативних клітин – початку формування спор, так і повної споруляції (зріла культура). Штами *B. subtilis* культивували на рідкому поживному середовищі Лурія-Бертані (LB) упродовж 72 годин на орбітальному шейкері-інкубаторі за температури не менше 28 – 30°C за загальноприйнятими методами у мікробіології [84, 190].

В досліді передбачено варіанти обробки з наступним бактеріальним навантаженням: 1)  $2,0 \times 10^8$  клітин / 1 насінину; 2)  $2,0 \times 10^7$  клітин / 1 насінину; 3)  $2,0 \times 10^6$  клітин / 1 насінину; 4) контроль. Повторність – чотириразова.

Ефективність дії бактеріальних інокулянтів *B. subtilis* на ріст і розвиток *Triticum aestivum* L. досліджували за наступною схемою:

- 1 – контроль (без бактеризації);
- 2 – 9 (обробка відповідним штамом спороутворюючих бактерій *B. subtilis* у формі вегетативних клітин);
- 10 – 17 (обробка відповідним штамом бактерій *B. subtilis* у формі технологічної зрілості культури з повним виходом спор).

У модельному досліді насіння *Triticum aestivum* L. пророщували рулонним методом. Використано два шари зволоженого фільтрувального паперу у вигляді стрічок розміром 10 x 55 см, на які розкладали насіння зародками донизу в одну лінію з інтервалом до 1 см і на відстані 2,0 см від краю

(по 70 шт. в один ряд). Розкладене на папері насіння накривали зволоженими стрічками фільтрувального паперу і поліетилену такого ж розміру та не туго скручували в рулон. Загорнуті рулони ставили вертикально у склянки з водними розведеннями бактеріальної суспензії *B. subtilis* та розташовували у термостат при температурі 23 – 25°C (ДСТУ 4138-2002).

Контролювали рівень води у склянках, не допускаючи підсихання, за потреби у склянки з рулонами добавляли дистильовану воду (зміна води кожні 3-5 діб). У контрольному варіанті використовували воду. Лабораторний дослід проведено за такою схемою: 1 – без бактеризації (контроль); 2-7 – обробка бактеріальною суспензією штамів *B. subtilis* Н38, Н40 та Н45 ( $2,0 \cdot 10^7$  клітин/насінину). Показники проростання тест-культури (довжину коренів і проростків) на 10 добу визначали з використанням звичайної сантиметрової шкали. Статистичний аналіз проведено за програмою Statistica 8.0, дані обчислено за MS Excel.

Для порівняння рівня міжмікробної взаємодії використано метод радіальних штрихів за Єгоровим [47, 88]. Штами досліджуваних бацил попередньо вирощували на картопляному агарі (КА) впродовж 18 годин при 28°C. 18-годинну культуру бацил висівали в центр чашки з середовищем КА. Після 3 діб культивування при 28°C підсівали радіальними штрихами суспензії ( $10^9$  КУО/мл) добових тест-культур фітопатогенних бактерій, а також мікромцієтів.

Облік результатів проводили через 18–24 годин інкубування при діапазоні 28°C – 37°C за зонами затримки росту досліджуваних культур і виражали в міліметрах. Якщо зони затримки росту фітопатогенних бактерій були відсутні або < 1 мм, досліджувані штами бацил вважали неактивними, 1–10 мм – слабо активними, 11–20 мм – середньо активними, більше 20 мм – високоактивними.

Відсутність зростання штриха тест-мікроорганізму на тій чи іншій відстані від блоку вказує на пригнічення його антибіотичною речовиною

досліджуваного організму.

Здатність до утворення біоплівки на поверхнях рослин вивчали експрес-методом на моделі пшениці (*Triticum vulgare*). Насіння тест-рослин стерилізували за допомогою 25,0% перекису водню одну хвилину, потім триразово промивали в стерильній воді та пророщували в умовах вологої камери протягом трьох діб. Суспензії добових культур *B. subtilis* доводили до концентрації  $10^8$  кл./мл стерильним фізіологічним розчином та вносили у лунки планшету (96 лунок) в об'ємі 1,5 мл. Для одного штаму одночасно використовували по 5 лунок (5-разове повторення). Потім у кожен лунку поміщали проросток пшениці. Інкубацію здійснювали при 37°C впродовж 24 та 48 годин. Після інкубації проростки промивали у фізіологічному розчині. Утворені біоплівки на поверхнях рослин фіксували за допомогою 96,0% етанолу протягом 15 хвилин та забарвлювали 1,0% розчином акридинового помаранчевого впродовж 5-7 хвилин. Забарвлені проростки пшениці висушували на предметних скельцях і після цього корінці обстежували на наявність біоплівки за допомогою мікроскопічних методів досліджень (EVOS FL Imaging System, Thermo Fisher Scientific, USA; збільшення  $\times 100$ ). Сформованість біоплівки оцінювали за системою чотирьох плюсів [226].

#### Критерії оцінки сформованості біоплівки

Значення	Критерії
—	Адгезія бактерій не фіксується, без формування біоплівки
+	Біоплівка представлена адгезованими клітинами практично без мікроколоній
++	Біоплівка представлена поодинокими сформованими мікроколоніями
+++	Біоплівка середньої товщини, фіксуються розриви у структурі
++++	Біоплівка середньої або більше товщини без

	розривів у структурі, якісне формування матриксу
--	--

Біотестування на модельних рослинних тест-системах (*Triticum vulgare*) та визначення впливу штамів бактерій *B. subtilis* на формування надземної і кореневої системи проводили за показниками висоти, маси дослідних рослин, ваговим методом. Бактеризація насіння суспензіями дослідних штамів *B. subtilis* (накопичувальні культури, робочий титр  $1,0 \times 10^{-7} - 4,5 \times 10^{-7}$  кл./мл) за експозицією 15 хв., розведення 1:1, 1:10, 1:100, 4-кратне повторення.

Біометричні показники рослин визначали вимірювально – ваговим методом в основні фази росту та розвитку рослин пшениці озимої.

Масу коренів рослин пшениці, вирощених у вегетаційному досліді, визначали ваговим методом після відмивання у водогінній воді і висушуванні при 100°C у сушильній шафі.

Вплив інокуляції насіння пшениці споровими бактеріями оцінювали в умовах модельних та польових дослідів в зоні Лісостепу України. Планування та проведення польового дослідів здійснювали за Б.О. Доспеховим [86].

Польові досліді у 2021-2023 рр. проводили за схемою:

1. Контроль (без обробки насіння хімічними та біологічними препаратами);

2. Інокуляція новим штамом *B. subtilis* Н40,  $\geq 10^6$  кл./насінину

3. Протруєння хімічним препаратом Фундазол, 50% з.п., 2 кг/га.

Облікова площа ділянок польових дослідів складала 10 м<sup>2</sup>.

Повторність дослідів 4-х разова, розміщення варіантів рендомізоване.

Для інокуляції насіння пшениці використовували суспензію бактерій, яку культивували на термоплатформі біотехнологічній орбітального руху при 220 об./хв. протягом трьох діб. Бактеріальне навантаження становило не менше  $10^6$  клітин/насінину. Концентрацію визначали в камері Горяєва. Насіння контрольного варіанту зволожували водою (до 2,0% від маси).

**Фотохімічну активність** проростків пшениці озимої визначали за стандартною методикою – біофізичним методом індукції флуоресценції

хлорофілу (ІФХ) портативним хронофлуорометром «Флоратест», розробленим Інститутом кібернетики імені В.М. Глушкова НАН України [209, 210].

Тест-зразки розташовували між пластинами виносного оптичного сенсора приладу та впродовж 4 хвилин реєстрували зміни флуоресценції хлорофілу з відповідним відображенням графіку отриманих даних. Спектральний діапазон вимірювання інтенсивності флуоресценції – від 670 до 800 нм. Темнова адаптація тест-рослин перед вимірюваннями становила 10 хвилин. Повторність вимірювань у кожному варіанті триразова. Отримані дані опрацьовано за допомогою програмного забезпечення «Флоратест» (індукційна крива у відносних одиницях еталона флуоресценції).

Для проведення досліджень з оцінки фотосинтетичного апарату рослин використано наступні показники:  $F_0$  – початковий «фоновий» рівень індукції флуоресценції;  $F_{pl}$  – рівень флуоресценції – «плато»;  $F_{max}$  – максимальне значення флуоресценції,  $F_{st}$  – стаціонарний рівень флуоресценції після світлової адаптації листа рослини; а також комплекс індексних показників:  $K_1$  – індикаторний показник впливу екзогенних факторів (ефект світлової фази фотосинтезу,  $(F_{max}-F_0)/F_{max}$ ),  $K_2$  – коефіцієнт індукції флуоресценції, індекс життєздатності (коефіцієнт спаду флуоресценції), що розраховувався за формулою  $R_{fd} = (F_{max}-F_0)/F_{st}$ , та «фотохімічне гасіння»,  $QP = (F_{max}-F_{st})/(F_{max}-F_0)$  [17]. Статистичну обробку експериментальних даних виконували з використанням програм Statistica 8.0, MS Excel.

**Для визначення ступеня приживаності нових штамів бактерій *B. subtilis*** в ризосферному ґрунті пшениці озимої застосовували метод резистентності мікроорганізмів до певної речовини [106, 107]. Резистентні форми *B. subtilis* отримували під дією стрептоміцину (ST) в концентрації 1100 мкг/мл середовища та канаміцину (КА) – 120 мкг./мл відповідно.

Чисельність мутантів у ризосфері рослин визначали методом глибинного посіву розведень ґрунтової суспензії на поживне середовище LB, повторність 5-разова. Контрольний підрахунок чисельності проведено за природно резистентними до антибіотиків мікроорганізмами (зразки без бактеризації

ризосфери рослин). Отриманими мутантами штамів *B. subtilis* інокулювали насіння пшениці озимої у модельному вегетаційному досліді, а після проростання насіння через кожні 10 діб визначали чисельність даних мікроорганізмів.

Веgetаційні досліді проводили у посудинах об'ємом 2,0 л по 25 рослин у кожному, повторність 10-разова. Грунт чорнозем типовий (рН водний – 5,6, вміст гумусу – 0,8-1,1%, загального азоту – 0,07%, рухомого фосфору (за Кірсановим) – 14 мг/100 г ґрунту, обмінного калію (за Кірсановим) – 11 мг/100 г ґрунту), вологість ґрунту підтримували на рівні 60,0% від повної вологоємності.

Інокуляцію новими штамми *B. subtilis* здійснювали з розрахунку 200-250 тис. бактеріальних клітин на одну насінину пшениці озимої.

**Статистичну обробку одержаних результатів** проводили за загальноприйнятими методами [85, 86] з комп'ютерним опрацюванням даних через MS Excel та програму Statistica 8.0. Для оцінки достовірності експериментальних даних, представлених у роботі, використовували параметричні критерії нормального розподілу, розраховуючи середнє арифметичне ( $X_{\text{ср.}}$ ) і середнє квадратичне відхилення ( $S_{X_{\text{ср.}}}$ ) за рівня значущості  $< 0,05$ .

Вплив результатів інокуляції (збільшення урожайності та розміру витрат) на показники економічної ефективності (собівартість, прибуток, рентабельність) визначали за допомогою методики детермінованого факторного аналізу [234].

В роботі використовували наступну двохфакторну модель:

$$C = B/Y, \text{ де:}$$

C – собівартість 1 т продукції, грн.;

B – витрати на 1 га, грн.;

Y – урожайність зерна, т.

Кількісний вплив зміни досліджуваних факторів на відхилення прибутку в розрахунку на 1 га визначали за наступною моделлю:

$$\Pi = (Y \times \Pi) - B, \text{ де:}$$

П – прибуток в розрахунку на 1 га, грн.;

У – урожайність, т/га;

Ц – ціна реалізації 1 т зерна, грн. (незмінна);

В – витрати в розрахунку на 1 га, грн.

Кількісний вплив зміни досліджуваних факторів на відхилення рентабельності виробництва зерна пшениці озимої визначали за трансформованою моделлю, яка відрізняється від традиційної моделі рентабельності ( $P = \Pi / C \times 100 \%$ ), а саме:

$$P = (U \times C / B - 1) \times 100\%, \text{ де:}$$

Р – рентабельність виробництва зерна пшениці озимої, %;

У – урожайність, т/га; Ц – ціна реалізації 1 т зерна, грн. (незмінна);

В – витрати в розрахунку на 1 га, грн.

## Висновки до розділу 2

Визначено об'єкт дослідження, яким є особливості розвитку і функціонування *B. subtilis* в ризосфері пшениці озимої, а також предмет дослідження – біологічні властивості штаму-продуценту *B. subtilis* та його вплив на рослини пшениці озимої.

Розроблено програму та схему теоретичних та експериментальних досліджень з вивчення характеристик біологічних властивостей *Bacillus subtilis* та особливостей мікробно-рослинної взаємодії в ризосфері пшениці озимої.

Визначені та описані методи проведення експериментальних досліджень: мікробіологічних, інструментальних, фізіолого-біохімічних, біофізичних, модельних вегетаційних, польових. Використано сучасні методи математично-статистичної обробки даних для представлення результатів дослідження.

### **РОЗДІЛ 3**

#### **МІКРОБІОМ РИЗОСФЕРИ ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ: ОСОБЛИВОСТІ СКЛАДУ, ВАРІАБЕЛЬНІСТЬ ІЗОЛЯТІВ СПОРОУТВОРЮЮЧИХ БАКТЕРІЙ ЗА ДІАГНОСТИЧНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ ПРИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ**

Мета представленого етапу роботи – дослідити бактеріальні ізоляти, відібрані з ризосфери пшениці озимої різних сортів вітчизняної селекції, через призму виявлених біологічних властивостей мікробіому.

На сьогоднішній час актуальні питання використання сучасних методів метагеноміки для вивчення ролі мікробних угруповань ґрунту у відновленні ґрунтової родючості, порушеної внаслідок дії техногенних факторів. Є перспектива досліджень щодо визначення відмінностей у функціональній структурі метагеномів ґрунтів, що маркують різні стадії ґрунтоутворення, аналізу головних груп функціональних генів (наприклад, відсоток мажорних груп, які відповідають за метаболізм і транспорт амінокислот, виробництво та перетворення енергії, а також транспорт і метаболізм вуглеводів) [178, 292].

Показано, що фактично будь-який агротехнічний прийом супроводжується помітною і статистично достовірною зміною структури мікробних угруповань, що в перспективі може бути використано для створення нових технологій управління ґрунтовою родючістю та універсальних підходів для аналізу агроекологічного стану ґрунтів за даними метагеномного аналізу [293-296].

Досліджуючи мікробіом ризосфери пшениці озимої, властивості домінуючих видів ґрунтових мікроорганізмів, можна ґрунтовно дослідити процеси, які відбуваються у конкретному середовищі (наприклад, активності мінералізаційних процесів за наявності спорових бактерій або мінералізація органічних сполук, забезпеченість органічним азотом, висока ферментативна активність, зміни умов аерації середовища та інше). За різними варіантами вирощування зернових культур та за їх сортовим різноманіттям виявляють як



кількісні розбіжності у представленості окремих типів мікроорганізмів, так і якісні зміни у складі мікробіому.

### **3.1. Особливості зміни чисельності та складу мікробіому ризосфери пшениці озимої в процесі онтогенезу**

Прокаріотний комплекс ґрунту завдяки різним механізмам взаємодії є взаємовигідним для рослин, зокрема, через оптимізацію надходження поживних речовин у рослини, антагонізм до інших мікроорганізмів, особливо патогенних, синтез регуляторів росту або посилення вторинних метаболічних шляхів, які без посередньо пов'язані з підвищенням стресостійкості рослин. Дослідженнями вчених показано, що загальна чисельність мікроорганізмів ризосфери активно змінюється за фазами розвитку зернових культур (*Triticum aestivum* L., *Hordeum distichon* L., *Avena sativa* L.) [1, 9, 11]. Прослідковуються певні однотипні зміни для ячменю, пшениці в стадію кущіння, де загальна чисельність мікроорганізмів в мінімальна і надалі досягає максимальних показників на стадії колосіння.

Зміна чисельності бактеріальних угруповань ризосфери в процесі вегетації пов'язана насамперед зі зміною складу й кількості корневих ексудатів рослин, які є джерелом живлення для мікроорганізмів. Заселеність мікроміцетними формами та їхня видова структура як ризосфери, так і колосу може корелювати з темпами розвитку відповідних ізогенних ліній (наприклад, таких, що детермінуються домінантним/рецесивним станом генів VRN). Тому гени опосередковано (через участь у регуляції фізіолого-біохімічних процесів) можуть бути залучені у формуванні та функціонуванні мікоценозу пшениці м'якої (сорт Миронівська 808). Доведено, що фактично будь-який агротехнічний прийом супроводжується помітною і статистично достовірною зміною структури мікробних угруповань, що в перспективі може бути використано для створення нових технологій управління ґрунтовою родючістю та універсальних підходів для аналізу агроекологічного стану ґрунтів за даними метагеномного аналізу [1, 10]. Багаторічні застосування високих доз мінеральних добрив пригнічують розвиток азотфіксуючих,

целюлозоруйнівних, мікроорганізмів, амоніфікуючих, водночас зростає активність мінералізації та денітрифікації, що призводить до втрат гумусу ґрунту і спричиняє зниження його стабільності [151].

Важливою характеристикою ризосферного мікробіому є співвідношення основних фізіологічних груп мікроорганізмів. Дослідження, які проведені Добровольським Г.В., Патиною В.П., Волкогоном В.В., Іутинською Г.О., Тихоненко Д.Г., Ємцевим В.Т., Новосад К.Б., Патиною М.В. та іншими вченими створили фундаментальні основи сучасного уявлення про мікробіоту ґрунту. На сьогодні запровадження екологічно зорієнтованих технологій вирощування сільськогосподарських культур вимагає докладного вивчення особливостей функціонування агроценозів для встановлення закономірностей перебігу процесу формування продуктивності наземного фітоценозу та забезпечення сталого розвитку агросфери загалом.

На основі проведених експериментальних досліджень нами вивчено чисельність та склад мікробного комплексу ризосфери зернових культур (пшениці озимої різних сортів вітчизняної селекції) у процесі онтогенезу.

Результати визначень чисельності ґрунтових мікроорганізмів під пшеницею озимою свідчать про варіабельність мікробної біомаси по сортовим варіантам. Так, спостерігалось збільшення чисельності спороутворюючих бактерій: у варіантах вирощування сортів Трудівниця Миронівська, Манера Одеська, Лайнер, Легенда Білоцерківська та Поліська 90 у два рази (в середньому  $4,2 \times 10^7$  КУО/г) порівняно з Міп Валенсія, Міп Дніпрянка та іншими сортами Селекційно-генетичного інституту НААН України ( $2,0 \times 10^7$  КУО/г ґрунту). Це свідчить про активізацію бацилярних форм мікроорганізмів при онтогенезі рослин пшениці, табл. 3.1.

У ризосфері сортів озимої м'якої пшениці зафіксовано розвиток вільно існуючих форм мікроорганізмів роду *Azotobacter*. Чисельність мікроміцетів за сортовими варіантами варіювала від 38,27 до 53,45 тис. КУО/г ґрунту.

Таблиця 3.1 – Мікробіологічний аналіз зразків, відібраних з ризосфери пшениці озимої різних сортів вітчизняної селекції (ВП НДГ «Агрономічна дослідна станція», 2020 р.)

Фізіологічні групи /поживне середовище/ кількісна одиниця	СОРТИ ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ ( <i>Triticum aestivum</i> L.)									
	Лайнер (тверда)	Прозорий (тверда)	Шляхетний (тверда)	Намисто	Щедрівка Київська	Поліська 90 (еталон)	Легенда Білоцерківська	Лісова пісня	Муза Білоцерківська	Здоба Київська
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
м/о, (МПА),	10,07±	10,27±	15,00±	10,27±	15,90±	11,70±	15,84±	11,70±	16,08±	12,18±
млн КУО/г	0,29	0,90	1,03	0,96	0,87	0,55	0,90	0,46	1,03	0,94
м/о, (КАА),	15,03±	14,20±	11,93±	14,30±	12,30±	12,0±	13,90±	16,25±	14,52±	13,94±
млн КУО/г	0,72	0,37	1,01	0,41	1,06	1,02	0,74	0,88	0,78	0,75
Мікроміцети	<b>52,30±</b>	48,5±	43,5±	45,8±	40,1±	<b>52,8</b>	<b>53,45</b>	44,6±	47,3±	48,6±
тис. КУО/г	1,02	0,98	1,02	0,96	0,87	±1,00	±1,02	0,95	0,67	0,74
спорові бактерії	<b>3,72</b>	2,3±	1,99±	1,54±	1,65±	<b>4,20</b>	<b>4,0</b>	2,50±	1,59±	1,77±
(LB),	±1,03	0,67	0,65	0,98	0,78	±0,98	±1,06	0,98	0,82	0,92
млн КУО/г										

**Примітка:** м/о – мікроорганізми; млн КУО/г ґрунту; ( тис. КУО/г ґрунту);

продовження табл. 3.1

Фізіологічні групи м/о /поживне середовище/ кількісна одиниця		СОРТИ ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ ( <i>Triticum aestivum</i> L.)							
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Міп Валенсія	Міп Дніпрянка	Трудівниця Миронівська	Миронівська слава	Ветеран	Гарантія Одеська	Манера Одеська	Нива Одеська	Традіція Одеська	
м/о, (МПА), млн КУО/г	15,27± 0,71	14,64± 0,33	16,13± 1,05	13,11± 0,16	20,97± 1,59	14,96± 1,09	16,77± 0,71	9,45± 0,58	8,60± 0,67
м/о, (КАА), млн КУО/г	14,56± 0,87	16,60± 0,98	13,19± 0,94	14,50± 0,78	15,38± 0,76	13,41± 0,79	11,99± 1,02	13,95± 0,74	16,60± 0,63
Мікроміцети тис. КУО/г	47,60± 1,05	38,90± 1,20	43,0± 0,98	38,27± 0,95	40,9± 1,02	39,0± 0,93	51,2± 1,08	37,8± 0,88	39,9± 0,91
спорові бактерії (LB), млн КУО/г	1,98± 0,68	1,67± 0,78	4,0± 1,05	2,0± 0,65	2,1± 0,86	1,88± 0,92	3,79± 0,82	1,66± 0,66	1,72± 0,83
Примітка: м/о – мікроорганізми; млн КУО/г ґрунту; ( тис. КУО/г ґрунту);									

Результати досліджень мікробіому ґрунту в агроценозі пшениці озимої продемонстрували значну диференціацію чисельності мікроорганізмів основних еколого-трофічних і фізіологічних груп залежно від агротехнологій та сорту рослин (табл. 3.2).

Чисельність олігонітрофільних бактерій в орному шарі ґрунту в посівах пшениці озимої протягом вегетації зростала та варіювала у межах 169-302 млн. КУО/г ґрунту (за виключенням варіанту з сортом пшениці Міп Дніпрянка), що свідчить про проходження азотфіксувальних процесів. Азот істотно впливає на формування елементів продуктивності рослин.

Відомо, що пшениця озима має тривалий період вегетації, восени сильно кущиться і розвиває потужну кореневу систему, рано навесні відновлює ріст і засвоює порівняно велику кількість азоту – від початку появи сходів до фази трубкування 75-90% від загального його виносу. Отже, відновлення вегетації озимої пшениці навесні супроводжується інтенсивними ростовими процесами, в зв'язку з чим у рослин озимої пшениці виникає гостра потреба в поживних ресурсах. Проте через низькі температури й підвищену вологість ґрунту, які пригнічують нітрифікацію, вміст азоту в кореневмісному шарі рано навесні, як правило, буває недостатнім, що зумовлює настання в озимої пшениці першого критичного періоду в азотному живленні рослин.

Спостереження за бімасою бактерій (живим і чутливим компонентом органічної речовини) під різними сортами пшениці озимої свідчать про зростання цього показника з 6 до 9 т/га.

Вважається, що стан мікробних угруповань ґрунту залежить від систем землеробства, від використовуваних агротехнічних прийомів (застосування добрива, обробітку культур, виду сівозміни, техніки зароблення рослинних решток) [8, 107]. Так, за варіантами дослідження міститься 75-132 млн. стрептоміцетів в 1 г. Відносна кількість грибів у варіантах Міп Дніпрянка, Поліська 90, Намисто та Щедрівка Київська була вищою проти інших сортових варіантів (наприклад, Гарантія Одеська, Лісова пісня, Трудівниця Миронівська, див. табл. 3.2).

Чисельність бактерій на різних поживних середовищах (МПА, ГА, МПА +СА) не була стабільною та змінювалась в діапазоні від 5,8 до 231 x 10<sup>6</sup> КУО/г сухого ґрунту.

Таблиця 3.2 – Кількість і біомаса ґрунтових мікроорганізмів при вирощуванні різних сортів *Triticum* за різних агротехнологій (середні дані за 2019–2020 рр.)

Варіант	Біомаса бактерій, т/га	Бактерії, на середовищах			Олігонітрофільні бактерії	Гриби	Стрептоміцети	Целюлоруйнуючі, тис/г сухого ґрунту
		МПА	МПА+ СА	ГА				
		10 <sup>6</sup> КУО/г сухого ґрунту						
Намисто	6,9	11	6,0	136	169	3,2	75,0	28,6
Гарантія Одеська	7,7	27	8,1	179	192	2,9	89,3	26,1
Лісова пісня	8,4	31	9,2	199	223	2,8	92,1	36,5
Трудівниця Миронівська	8,8	36	9,4	217	298	2,9	111,0	33,7
Міп Дніпрянка	6,9	21	7,3	154	1871	3,6	98,0	22,7
Міп Валенсія	8,5	32	8,8	200	265	2,6	132,0	35,5
Поліська 90	5,7	14	5,8	127	176	3,4	87,0	26,4
Щедрівка Київська	6,6	19	6.4	135	183	3,0	79,2	27.5
Традиція Одеська	7,1	24	7.4	165	193	2,7	90,4	30,2
Манера Одеська	9,1	39	9.1	231	302	2,5	101,2	34,6
Лайнер	8,4	33	8,7	202	244	2,8	112,3	31,2
Валенсія	8,5	35	8,6	210	276	2,8	130,0	33,0
НІР <sub>0,5</sub>	1,0	2,4	1,2	23,0	20,1	0,4	17,0	2,7

Результати досліджень показали, що за вирощування різних сортів пшениці озимої спостерігається стабільні показники інтенсивності виділення CO<sub>2</sub> – від 5,2 до 7,0. Аналогічно спостерігали динаміку поглинання O<sub>2</sub> не більше 5,3-6,8 (табл. 3.3).

Таблиця 3.3 – Інтенсивність виділення CO<sub>2</sub> і поглинання O<sub>2</sub> у ґрунті при вирощуванні пшениці за різних агротехнологій

Варіант	Інтенсивність виділення CO <sub>2</sub> і поглинання O <sub>2</sub> в мкг/г	
	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
Намисто	5,7	5,5
Гарантія Одеська	6,4	6,4
Лісова пісня	5,9	5,7
Трудівниця Миронівська	6,0	5,9
Міп Дніпрянка	5,9	5,9
Міп Валенсія	6,1	6,0
Поліська 90	5,2	5,3
Щедрівка Київська	5,6	5,5
Традиція Одеська	6,0	5,9
Манера Одеська	7,0	6,8
Лайнер	6,7	6,6
Валенсія	6,7	6,5

Примітка:  $x/P = 0,05$ ;  $t_{st} = 3,11$

Це свідчить про те, що в дослідному ґрунті створюються оптимальні умови для життєдіяльності мікроорганізмів, у результаті чого підвищується його біологічна активність.

У результаті проведених мікробіологічних досліджень із визначення чисельності та складу мікробіому пшениці озимої показано варіабельність мікробної біомаси за сортовими варіантами. Встановлено активізацію бацилярних форм мікроорганізмів за онтогенезу рослин (збільшення чисельності спороутворюючих бактерій до  $4,2 \times 10^7$  КУО/г у варіантах вирощування окремих сортів). Значна диференціація спостерігається під час аналізу чисельності мікроорганізмів основних фізіологічних груп залежно від сорту рослин. Так, зафіксовано розвиток вільно існуючи

х форм мікроорганізмів роду *Azotobacter*. Чисельність мікроміцетів за сортовими варіантами варіювала від 38,27 до 53,45 тис. КУО/г ґрунту. А чисельність олігонітрофічних бактерій в орному шарі ґрунту в посівах пшениці озимої упродовж вегетації зростала до 169-302 млн КУО/г ґрунту, що свідчить про проходження азотфіксаційних процесів. За показником біомаси бактерій під різними сортами пшениці озимої показано стабільне зростання із 6 до 9 т/га. Водночас чисельність бактерій на різних поживних середовищах (МПА, ГА, МПА +СА) не стабільна та змінна в діапазоні від 5,8 до  $231 \times 10^6$  КУО/г сухого ґрунту. Встановлено, що за вирощування різних сортів пшениці озимої спостерігається стабільні показники інтенсивності виділення  $\text{CO}_2$  – від 5,2 до 7,0. Аналогічні спостереження щодо процесу поглинання  $\text{O}_2$  (не більше 5,3-6,8).

Отже, за результатами аналізу чисельності мікроорганізмів ризосфери пшениці озимої встановлено, що сортова специфічність мала значний вплив на формування мікробіому в різні фази росту й розвитку рослин, що, очевидно, є інтегральним показником функціональної та метаболічної активності ґрунтових мікроорганізмів. Встановлено, що чисельність та склад мікробного комплексу ризосфери пшениці озимої в процесі онтогенезу значно змінюється, особливо за співвідношенням чисельності спороутворюючих та неспорових форм мікроорганізмів за однакових умов агротехніки вирощування культури. Загальний пул сапротрофних мікроорганізмів ризосфери змінюється на користь екологіопластичних бацил, тому пошукові дослідження біоагентів роду *Bacillus* актуальні для аграрної науки та практики. Подальші комплексні аналізи будуть сфокусовані через призму оцінки різноманітності ізолятів за результатами мікробіологічних, фізіолого-біохімічних, молекулярно-біологічних методів досліджень.



### 3.2 Морфологічна та фізіолого-біохімічна варіабельність ізолятів спороутворюючих бактерій, відібраних з агроценозу пшениці озимої

В результаті пошукових досліджень було виділено 29 ізолятів бактерій, колонії яких мали світло сіре або кремове забарвлення. З ризосфери пшениці озимої у фазу трубкування – відібрано 17 ізолятів бактерій, а у фазу колосіння-наливу зерна – 12 (рис. 3.1, 3.2).

В результаті проведеного мікробіологічного аналізу відібраних ізолятів виявлено, що найчастіше представлено морфолого-колоніальне різноманіття спорових та мікроміцетних форм мікроорганізмів, що пояснюється достатніми умовами вологозабезпечення рослин пшениці в період вегетації (від початку весняної вегетації), а також сортовими особливостями.

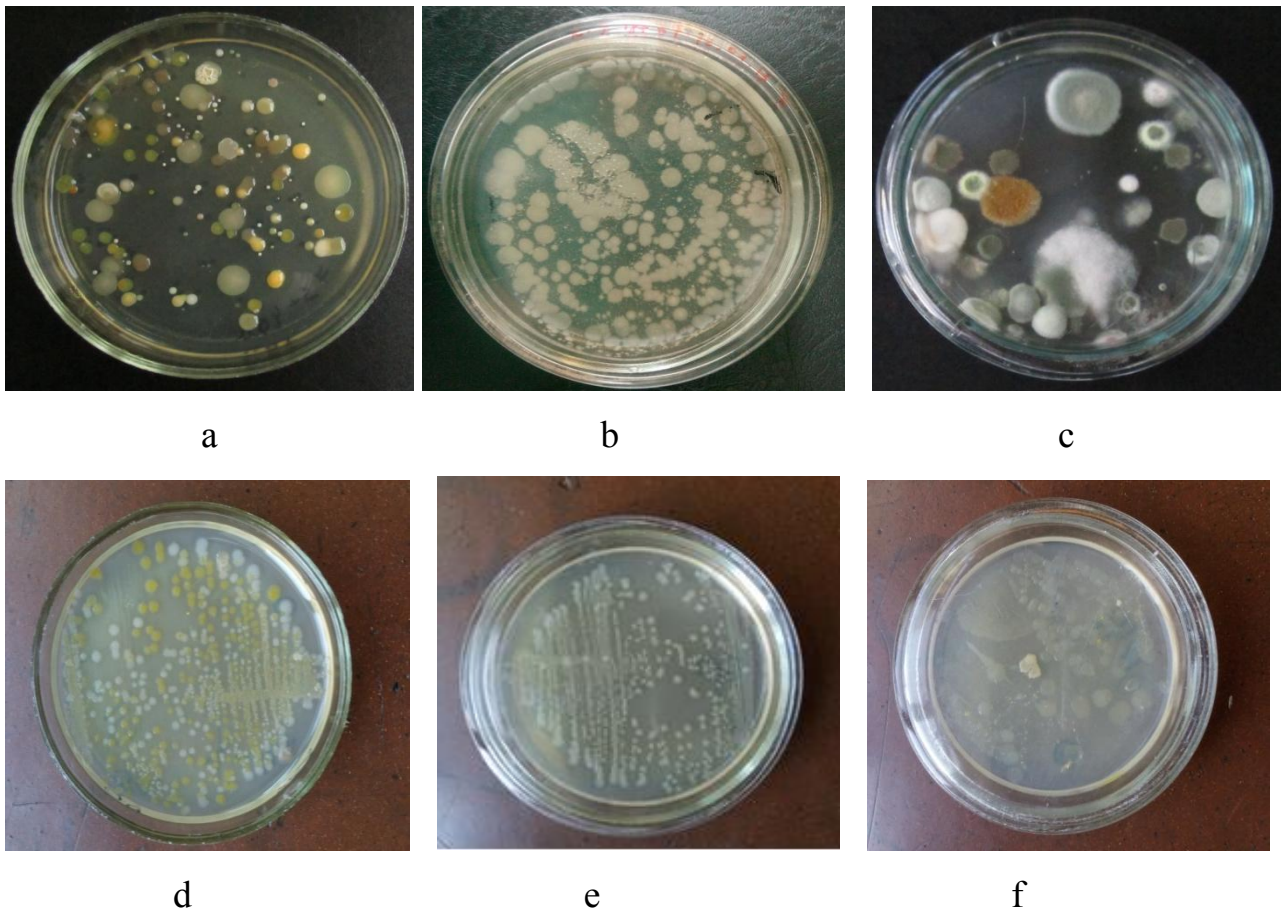


Рисунок 3.1 — Морфолого-колоніальне різноманіття спорових (a, b, d, e) та мікроміцетних (c, f) форм мікроорганізмів, ізольованих з ризосфери пшениці озимої



Рисунок 3.2 — Скринінг цільових спорових бактерій, які відрізнялись морфологією колоніального різноманіття мікробних угруповань ґрунту

Відібрані бактеріальні культури характеризуються R-типом колоній: шорсткі, зморшкуваті, матові, з хвилястим краєм (табл. 3.4).

За результатами первинного скринінгу з ризосфери пшениці озимої для досліджень відібрано 19 ізолятів бактерій, колонії двох з яких мали жовте забарвлення, 15 – сіре забарвлення та 2 – кремового або сірувато-білого кольору.

У фазу колосіння-наливу зерна пшениці озимої виділяли більшу кількість непігментованих ізолятів спорових бактерій. Дослідження бактеріальних ізолятів за морфологічними та фізіолого-біохімічними характеристиками дали такі результати: у циклі розвитку бактерій утворюється паличкоподібний тип клітин, в основному, ці клітини представлені формою правильних паличок з закругленими кінцями. Розмір клітин варіював в діапазоні  $0,9-1,4 \times 2,5-3,6$  мкм. Клітини рухомі, розташовані у мазках у вигляді скупчень або одиничних ланцюжків різної довжини. Характеризуються як грампозитивні, некапсульовані. Зафіксовано утворення спор, які займали центральне положення в клітині за бацилярним типом розміщення. У культуральній рідині клітини рухомі, рухаються за допомогою перитрихіальних джгутиків.

Таблиця 3.4 – Тест морфологічних типів бактеріальних ізолятів

Ізоляти бактерій	Характеристика колоній виділених бактерій
1	Яскраво кремового кольору (жовтопігментована), злегка опукла, в'язка (Хм-1)
2	Сіра, поодинокі колонії, напівпрозора, край хвилястий
3	Непігментована, сірувато-білого кольору, злегка опукла, в'язка
4	Кремового кольору, злегка опукла, в'язка
5	Сіра, напівпрозора із злегка опуклим центром; сіра (одиночна) (Хм-3а)
6	Сіра, напівпрозора, край хвилястий
7	Сіра, одиночна, напівпрозора, край хвилястий; є жовтопігментовані колонії
8	Суміш жовтих і сірих колоній. Для досліджень відібрано сіру колонію бактерій
9	Сіра, напівпрозора, край хвилястий
10	Сіро-молочні, кремові, не прозорі
11	Сіро-молочні, кремові, не прозорі
13	Сіра, одиночна, напівпрозора, плоска, край хвилястий
14	Сіра, одиночна, напівпрозора, плоска, край хвилястий
15	Сіра, поодинокі, напівпрозора, плоска, край хвилястий
16	Сіра (в масі), напівпрозора, плоска, край хвилястий
17	Сіра (в масі), напівпрозора, плоска, край хвилястий
18	Сіра, напівпрозора, плоска, край хвилястий
19	Сірі, напівпрозорі, плоскі, краї хвилясті

Виявлено різноманіття морфолого-колоніальних типів ізолятів (від сірих до світло-кремових з різним розміром і формою краю). Колонії на поверхні універсальних поживних середовищ з'являлися через 17-22 години після посіву на

агаризовану поверхню, колонії сірувато-білі, не прозорі, плоскі, неправильної або округлої форми, поверхня дрібно-шорстка, край хвилястий, за консистенцією в'язкі. На поживному агарі більшість нових ізолятів при температурі +28°C утворює колонії сірого кольору, пастоподібної консистенції з нерівними порізаними краями. Діаметр колоній до 10-14 мм. В цілому, при тестуванні ізоляти проявляли ріст у температурному діапазоні +18...+37°C, а два ізоляти (Н10, Н45) були здатні рости у діапазоні +37...+40°C. При температурі понад +40°C і менше 15°C ріст спороутворюючих бактерій значно уповільнюється. По відношенню до рН середовища ізоляти продемонстрували здатність розвиватися при рН 4,5-8,0 (табл. 3.5). Розвиток бактерій за більш лужних умов (рН 9,0-10,0) не спостерігався. Оптимальне значення рН середовища з наступним формуванням повноцінних зрілих спор складає 7,1-7,5.

Таблиця 3.5 – Ріст бактеріальних ізолятів в різному діапазоні температур та рН

Ізоляти	Температура, °C					рН			
	+18...+25	+26...+32	+33...+35	+37	+40	4,5-5,0	5,5-6,0	6,5-7,0	7,5-8,0
Н3	+	+	+	—	—	+	+	+	+
Н10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Н11	+	+	+	+	—	+	+	+	+
Н13	+	+	+	+	—	+	+	+	+
Н17	+	+	+	+	—	+	+	+	+
Н26	+	+	+	—	—	+	+	+	—
Н36	+	+	+	—	—	+	+	+	+
Н28	+	+	+	+	—	+	+	+	+
Н33	+	+	+	+	—	+	+	+	+
Н34а	+	+	+	+	—	+	+	+	—
Н38	+	+	+	+	—	+	+	+	+
Н40	+	+	+	+	—	+	+	+	+
Н41	+	+	+	+	—	+	+	+	+
Н41 <sup>1</sup>	+	+	+	+	—	+	+	+	—
Н43	+	+	+	+	—	+	+	+	+
Н45	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Н51	+	+	+	—	—	+	+	+	—

Примітка: «+» – наявність ознаки, «—» – відсутність ознаки

Особливості росту і циклу розвитку ґрунтових ізолятів виражаються в тривалій лаг-фазі (до 48 годин) і протяжної постстаціонарної стадії розвитку без різкого зниження числа життєздатних клітин. Після двох діб культивування у МПБ ростуть у вигляді рівномірного помутніння середовища з утворенням невеликого осаду. На поверхні рідких середовищ штами утворюють тонку плівку (вуаль), під плівкою стовпчик середовища прозорий, пігментація відсутня, колір поживного середовища не змінюється.

Спектри вуглецевого живлення та ферментативна активність ізолятів Н38, Н40 виявилися ідентичними типовому штаму *B. subtilis* 8a (RCAM 00876). В якості єдиного джерела вуглецю ізоляти використовують з утворенням кислоти арабінозу, ксилозу, маніт, глюкозу, галактозу, фруктозу, мальтозу, сорбіт, гліцерин, декстрин, крохмаль, рамнозу і дульцит (з утворенням луку), табл. 3.6.

Таблиця 3.6 – Фізіолого-біохімічна характеристика грампозитивних спороутворюючих ізолятів із філосфери і ризосфери кореневої системи пшениці озимої та чорнозему типового

Тести	Ізоляти бактерій		Колекційний штам <i>B. subtilis</i> 8a
	Н3, Н10, Н13, Н36, Н38, Н40, Н43, Н45	Н11, Н17, Н26, Н28, Н33, Н34а, Н41, Н41 <sup>1</sup> , Н51	
1	2	3	4
Редукція нітратів до нітритів	+	+	+
Утворення: сірководню індолу	+	+	+
	—	—	—
Гідроліз – желатини	+	+	+
казеїну	+	+	+
Гідроліз – крохмалю	+	+	+
ріст на лакмусовому молоці			
Каталазна активність	+	+	+
Уреазна активність	—	—	—
Оксидазна активність	+	—	+
Використання (ферментація): глюкози	К	К	К

продовження табл. 3.6

1	2	3	4
арабінози	К	К	К
фруктози	К	К	К
сахарози	К	К	К
ксилози	К	К	К
галактози	К	К	+
манози	К	К	+
рафінози	К	–	+
саліцину	+	+	+
дульцитулу	+	+	+
мальтози	+	+	+
рамнози	+	+	+
сорбітолу	К	К	К
манітолу	К	К	К
інозитулу	К	К	К
Реакція Фогес-Проскауера	+	+	+

Примітка: «+» – наявність ознаки, «–» – відсутність ознаки, «К» – кислота.

В результаті проведених досліджень встановлено, що відбувається використання мінеральних форм азоту: солі амонію і нітрати, амінокислоти і білки. Ізоляти Н3, Н10, Н13, Н36, Н38, Н40, Н43, Н45 гідролізують казеїн, желатину, а також крохмаль і лакмусове молоко (з реакцією втрати кольору). Дослідні ізоляти каталазопозитивні.

Дослідні ізоляти не утворюють індол, редукують нітрати в нітрити. При культивуванні на діагностичних середовищах показано, що в процесі росту бактерії здатні утворювати ацетоїн (ацетил-метил-карбинол, АМК) на середовищах з пептоном і глюкозою. Штами, виділений з філоплани кореневої системи пшениці озимої, проявляють здатність до гідролітичного розщеплення крохмалю, аналогічні біохімічні властивості демонструють інші штами. Зона гідролізу при цьому становила від 2,8 до 4,0 мм. Штами мають протеолітичну активність, яка проявляється в розрідженні желатини і пептонізації казеїну молока.

При біохімічному тестуванні за допомогою тест-системи API встановлено, що досліджувані ізоляти бактерій відрізняються за спектром зброджуваних вуглеводів, редукцією нітратів та оксидазною активністю, табл. 3.7.

Встановлено, що ізоляти H38 і H40 за умов глибинної ферментації здатні рости при підвищених температурних діапазонах культивування (40°C), а оптимальний технологічний термін складає не менше 48 годин (за фактом початку споруутворення). Результати визначення фенотипових ознак дозволили припустити належність досліджуваних ізолятів бактерій до роду *Bacillus* sp. Крім цього, на підставі фізіолого-біохімічних властивостей виділені штами можливо віднести до виду *B. subtilis*.

Таблиця 3.7 – Біохімічне тестування ізолятів на стрипах API для споруутворюючих мікроорганізмів

Лунка	Субстрат	Реакція/ фермент	Ізолят H5	Ізолят H16	Ізолят H34	Ізолят H38	Ізолят H40	<i>B. subtilis</i> 8a
1	2	3	4	5	6	7	8	9
NO <sub>3</sub>	Азотнокислий калій	Редукція нітратів	–	–	–	+	+	+
TRP	L-триптофан	Виділення індолу	–	–	–	–	–	–
GLU	D-глюкоза	Зброджування	+	+	+	+	+	+
ADH	L-аргінін	Аргініндигідрол аза	–	–	+	+	–	–
URE	Сечовина	Уреаза	–	–	–	–	–	–
ESC	Заліза цитрат трьохзаміщений	Гідроліз (β-глюкозидаза)	–	+	–	+	+	+
GEL	Желатина	Желатиназа	+	+	–	+	+	+
PNPG	2-нітрофеніл-β-D-галактозид	β-галактозидаза	+	+	+	–	+	+
GLU	D-глюкоза	Асиміляція	+	+	+	+	+	+
ARA	L-арабіноза	Асиміляція	+	+	+	+	+	+
MNE	D-маноза	Асиміляція	+	+	+	+	+	+
MAN	D-манітол	Асиміляція	+	+	+	+	+	+
NAG	N-ацетил-глюкозамін	Асиміляція	+	+	+	+	+	+

продовження табл. 3.7

1	2	3	4	5	6	7	8	9
MAL	D-мальтоза	Асиміляція	+	+	–	+	+	+
GNT	Глюконат калію	Асиміляція	+	+	+	+	+	+
CAP	Капріонова кислота	Асиміляція	–	+	–	–	–	–
ADI	Адипінова кислота	Асиміляція	–	–	–	–	–	–
MLT	Яблучна кислота	Асиміляція	+	+	–	+	+	–
CIT	Натрію цитрат трьохзаміщений	Асиміляція	+	+	+	+	+	+
PAC	Фенілоцтова кислота	Асиміляція	+	–	–	+	+	+
Оксидаза			–	–	–	+	+	+

*Примітка:* «–» – ознака негативна; «+» – ознака позитивна

Систематика (таксономічне положення) різних видів спороутворюючих бактерій активно розвивається і змінюється в наслідок розширення та накопичення нових даних. Для отримання необхідної інформації вивчають все різноманіття та особливості зовнішньої і внутрішньої структури мікроорганізму, його фізіологічні, біохімічні властивості, а також процеси, які викликають ці мікроорганізми в середовищі свого існування [1, 3, 16, 97]. Основою визначення таксономічного положення, як і раніше, залишаються: морфологічні властивості клітин (форма, розміри, взаємне розташування, спороутворення, забарвлення за Грамом та інше); культуральні, біохімічні, антигенні характеристики, а також чутливість до різних антимікробних впливів і ступінь генетичного споріднення з представниками інших таксонів (гомології нуклеїнових кислот і здатності до обміну генетичною інформацією). Таким чином, для визначення видової належності тестованого ґрунтового або ризосферного ізоляту до відповідної таксономічної групи необхідно виконувати наступні науково-методичні принципи і підходи: дослідження морфологічних ознак (типів) ізолятів; характеристика



особливостей метаболізму, способу отримання енергії та інші фізіологічні властивості.

Крім морфолого-фізіологічних ознак для вирішення завдань ідентифікації у бактерій необхідно визначення таких показників, як патогенність по відношенню до інших організмів; вплив навколишнього середовища на життєдіяльність об'єкта (мікроорганізму), який вивчається; технологічність та стабільність властивостей біоагенту; характер зміни поживного середовища, в якому відбувається інтенсивний ріст, розвиток і накопичення біомаси тощо [178, 179].

Комплексні дослідження мікроорганізмів в умовах *in vitro* мають значення не тільки для номенклатури і таксономії, але і для оцінки ролі мікроорганізму в конкретних умовах середовища, а також його науково-практичну значимість. Необхідно створювати базис для подальшого вивчення генотипу бактеріальних культур, перспективних для використання в агромікробіології, біотехнології, проводити аналіз поліморфізму генів, які зумовлюють надзвичайну біологічну, технологічну активність. Слід зазначити, що поліморфізм мікробіому спороутворюючих бактерій являє собою дискусійну платформу. Паразитизм або симбіотична взаємодія «мікроорганізму – середовища» супроводжується розвитком значної біохімічної диференціації, яка виражається в більш вузької трофічної спеціалізації та залежності від багатьох факторів росту (вітамінів, амінокислот тощо). Клітини бактерій роду *Bacillus* розрізняються здатністю і стратегіями колонізації поживних середовищ різної щільності. А виникнення морфологічних варіантів в процесі дисоціації (особливий тип мінливості, розщеплення однорідної популяції бактерій на варіанти, які відрізняються генетичними, фізіолого-біохімічними, морфологічними властивостями) збільшує гетерогенність конкретних популяцій мікроорганізму за рухливістю та здатністю до хемовідповіді. Як відомо з літературних джерел, порушення процесу спороутворення у бактерій може бути пов'язано зі зміною їх фізіологічних та біохімічних властивостей, недостатнім надходженням поживних речовин в середовище тощо [180].

В результаті проведеного мікробіологічного аналізу відібраних ізолятів виявлено, що найчастіше представлено морфолого-колоніальне різноманіття спорових та мікроміцетних форм мікроорганізмів, що пояснюється достатніми умовами вологозабезпечення рослин пшениці в період вегетації (від початку весняної вегетації), а також сортовими особливостями. Загальний пул сапротрофних мікроорганізмів ризосфери може змінюватись на користь екологопластичних бацил. Розширення наукових знань щодо біологічних характеристик та варіабельності ґрунтових мікроорганізмів, адаптованих до умов ризосфери пшениці озимої набуває актуальності. Важливо проводити відбір штамів-продуцентів з високою здатністю до колонізації, стійкості та інтеграції компонентів рослинно-мікробних систем в умовах сучасного агровиробництва, техногенного навантаження та стресів, в тому числі з акцентом на ефективність біоконтрольних функцій ризосферних бактерій (антифунгальна активність та інше).

За основними типами колоній виявлено наступні R-форми: сірі, профіль плаский, структура дрібнозерниста, не прозорі з дрібно-шорсткою поверхнею, діаметр до 10 мм (1 тип); кремові, нерівний край, профіль плаский, шорсткі, діаметр до 7 мм (2 тип); сірувато-білі, ризоїдний або хвилястий край, шорсткі, в'язкі, діаметр до 13 мм (3 тип). Аналізуючи перспективні штами за фізіологічним станом клітин популяцій ґрунтових мікроорганізмів в аспекті властивостей спороутворення при культивуванні на рідких поживних середовищах показано, що інтенсивність розвитку окремих штамів при рівних умовах і за однаковий проміжок часу (через 48-72 години) має певні особливості. Вільні спори (до 90,0%) спостерігали в аксенічних культурах вже через 72 години культивування, проспори (до 10,0%) за всіма виявленими моноізолятами 1-3 морфотипу, що відповідає результатам, отриманим [180, 181]. В ході селекції та послідовних генерацій важливо проводити відбір перспективних штамів ризосферного ґрунту, що поєднують практично цінні властивості, технологічність і стабільність морфологічних ознак. Фізіологічні параметри росту (температурний режим, рН середовища), при яких можуть ефективно розмножуватись бактерії, є важливим

показником [20, 182]. Продемонстрований широкий діапазон росту дослідних ізолятів вказує на їх високі адаптивні властивості та життєздатність при різних температурах, рН. Отримані результати важливі для подальшого відбору перспективних спороутворюючих штамів для рослинництва, ґрунтознавства.

Як видно з проведеного блоку експериментальних робіт, за ключовими морфологічними, фізіолого-біохімічними характеристиками виділені штами (НЗ, Н10, Н13, Н36, Н38, Н40, Н43, Н45) споріднені з колекційним штамом *B. subtilis* 8а. Різноманітність умов росту досліджених бактерій дозволяє припустити, що вони мають потенційно корисні фізіолого-біохімічні властивості, у тому числі термостабільність та стійкість у широкому діапазоні значень рН. Для підтвердження видової належності представників мікробного угруповання ризосферного ґрунту пшениці озимої в подальшому буде проведено ідентифікацію цих штамів із використанням молекулярно-біологічного методу (порівняльного аналізу нуклеотидних послідовностей гена 16S РНК бактерій р. *Bacillus*).

Таким чином, різноманітність морфологічних та біохімічних особливостей різновидів спороутворюючих бактерій роду *Bacillus* обумовлює відмінності в спектрі їх дії і прояві біологічних властивостей в природному середовищі. Порівнюючи результати, які отримано в нашому дослідженні з результатами, описаними у наукових публікаціях можна відмітити, що морфологічна та фізіолого-біохімічна характеристика нових ізолятів бактерій, відібраних з агроценозу пшениці озимої, поглиблює наші знання з фундаментальної точки зору. Найбільш технологічними виявляються моноізоляти трьох культурально-морфологічних типів (R-форми) з високою швидкістю росту, спороутворенням, а також стабільністю при пасажах і змінах умов культивування. Ізоляти ідентифіковано за результатами вивчення фенотипових та фізіолого-біохімічних властивостей, встановлено їх відповідність до референтного штаму *Bacillus subtilis* 8а. На основі отриманих результатів можна припустити, що завдяки своїм біологічним властивостям штами природного типу НЗ, Н10, Н13, Н36, Н38, Н40, Н43, Н45 можуть бути перспективними для розробки ефективних технологій

виробництва мікробних препаратів, а також всебічного вивчення механізмів рослинно-мікробних взаємодій (за типом індукційних трансформацій на морфологічному, цитологічному, фізіолого-біохімічному, генетичному рівнях в організмі). Експериментальні дані підтверджують актуальність розширення наукових знань щодо біологічних характеристик нових штамів *Bacillus subtilis* і пошуку специфічних продуцентів метаболітів, адаптованих до умов ризосфери пшениці озимої.

### Висновки до розділу 3

В агроєкосистемах мікроорганізми є основним фактором ґрунтоутворювального процесу, живлення рослин і фітосанітарного стану ґрунту. Тому всі заходи, спрямовані на відновлення ґрунтової родючості і підвищення продуктивності, екологічної безпеки аграрного виробництва, тісно пов'язані з діяльністю мікроорганізмів. Підвищена локальна активність, біомаса і різноманітність мікробіоти є однією з найважливіших характеристик, які відрізняють ризосферу від загального обсягу ґрунту.

Встановлено, що сортова специфічність значно пов'язана з особливостями формування мікробіому у різні фази росту і розвитку рослин, що є інтегральним показником функціональної та метаболічної активності ґрунтових мікроорганізмів. Показано, що чисельність та склад мікробного комплексу ризосфери пшениці озимої у процесі онтогенезу значно змінюється, особливо за співвідношенням чисельності спороутворюючих та неспорових форм мікроорганізмів при однакових умовах агротехніки вирощування культури.

Загальний пул сапротрофних мікроорганізмів ризосфери продемонстрував варіабельність біомаси та зміни на користь екологопластичних бацил. Встановлено збільшення чисельності спороутворюючих бактерій до  $4,2 \times 10^7$  КУО/г у варіантах вирощування окремих сортів. Показано, що при вирощуванні різних сортів пшениці озимої спостерігається стабільні показники інтенсивності

виділення  $\text{CO}_2$  – від 5,2 до 7,0. Аналогічну динаміку прослідковано за показником поглинання  $\text{O}_2$  (зафіксовані дані в межах 5,3-6,8 мкг/г год.).

Здійснено комплексний аналіз морфологічної та фізіолого-біохімічної варіабельності ізолятів спороутворюючих бактерій, відібраних з агроценозу пшениці озимої. У фазу колосіння-наливу зерна скринінговими дослідженнями виявлено непігментовані форми колоній бактеріальних ізолятів, 19 з яких віднесено до колоніально-морфологічного різноманіття R-типу з діаметром від 7 мм до 13 мм.

При аналізі фізіологічного стану клітин популяцій ґрунтових ізолятів встановлено технологічну специфічність за параметрами інтенсивності формування спор за рівних умов і термінів інкубації (до 48-72 годин). Зафіксовано до 90,0% вільних спор в аксенічних культурах вже через 72 години культивування та не більше 10,0% проспору у дослідних моноізолятів зі стабільними морфологічними ознаками.

Встановлено, що ізоляти Н10 і Н45 проявили здатність до росту при підвищених температурах культивування ( $+37...+40^\circ\text{C}$ ). По відношенню до рН середовища ізоляти здатні рости при широких діапазонах рН 4,5-8,0.

При диференційному діагностичному тестуванні виявлено, що як єдине джерело вуглецю дослідні ґрунтові ізоляти використовують з утворенням кислоти арабінозу, ксилозу, маніт, глюкозу, галактозу, фруктозу, мальтозу, сорбіт, гліцерин, декстрин, крохмаль, рамнозу і дульцит (з утворенням луку). Спостерігається активне використання мінеральних форм азоту: солі амонію і нітрати, амінокислоти і білки. Ізоляти гідролізують казеїн, желатину, крохмаль, а при рості у молоці з лакмусом відбувається відновлення лакмусу. Мають каталазну активність та виявились оксидазопозитивними.

При біохімічному тестуванні за допомогою тест-системи API встановлено, що досліджувані ізоляти бактерій відрізняються за спектром зброджуваних вуглеводів, редукцією нітратів. Так, ізоляти Н38 і Н40 за умов глибинної ферментації проявили здатність росту при підвищених температурних діапазонах культивування ( $40^\circ\text{C}$ ) протягом 48 годин (за фактом початку спороутворення).

Отже, за ключовими морфологічними і біохімічними ознаками штами Н3, Н10, Н13, Н36, Н38, Н40, Н43, Н45 споріднені з референтним штамом *B. subtilis* 8а та віднесено до роду *Bacillus* sp., виду *B. subtilis*.

## РОЗДІЛ 4

**ОСОБЛИВОСТІ ВІДПОВІДІ РОСЛИН ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ НА ІНТРОДУКЦІЮ БАКТЕРІЙ *BACILLUS SUBTILIS* – ПРОДУЦЕНТІВ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНИХ СПОЛУК І РЕГУЛЯТОРІВ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ**

Активізація мікробно-рослинної взаємодії розглядається як потужний фактор формування та підвищення продуктивності агроєкосистем, але потенціал мікроорганізмів – продуцентів біологічно-активних сполук і регуляторів фізіологічних процесів на сьогодні використовується недостатньо. Актуальним є дослідження щодо вивчення активних продуцентів метаболітів, що позитивно впливають на рослини, а саме спороутворюючих бактерій *B. subtilis* як чутливих і динамічних компонентів мікробіому ґрунту, особливо в умовах антропогенного навантаження.

Для забезпечення ефективної інтродукції в агроценози сільськогосподарських культур ґрунтових мікроорганізмів у вигляді різних препаративних форм необхідно враховувати ряд аспектів, які пов'язані з характеристикою штаму-продуценту, особливостями його взаємодії, збереженістю стабільності та життєздатності тривалий період, а також з особливостями і технологією вирощування конкретної культури, до кореневої зони якої здійснюється інтродукція корисних мікроорганізмів [1, 107, 166-168]. Методи інокуляції насіння, які використовуються для дослідницьких цілей, часто неможливо використовувати за промисловими масштабами, крім цього існують значні технічні проблеми з підтримкою життєздатних мікробних інокулятів на насінні протягом процесів обробки та зберігання насіння, про що зазначається у низки наукових праць O'Callaghan (2016), Kurdish (2018) [166, 167].

Інші дослідження показують позитивні ефекти інокуляції насіння бактеріями р. *Bacillus*, такі як Santos et al. (2021), де дослідники дійшли до висновку, що інокулянт на основі композиції *Bacillus subtilis* та *B. megaterium* ефективний для врожайності зернових культур, а також для підвищення вмісту

білка та покращення засвоюваності рослинної клітковини. У інших дослідженнях Guimarães et al. (2021) показано, що використовуючи подібні інокулянти, можна досягти високої ефективності при вирощуванні зерно-бобових, внаслідок чого продуктивність статистично перевищує контроль без інокуляції [213, 214].

Вельми перспективно створення інокулянтів, що складаються з асоціацій бактерій з адитивними і синергічними ефектами на рослини і підвищують стійкість рослинно-бактеріальної системи. Крім цього, при використанні різних інокулянтів необхідно враховувати бактеріальне навантаження на насінину, а також технологічні показники препаративних форм, які обрані для застосування [169, 170].

Описано позитивний синергічний ефект від інтродукції змішаних культур ґрунтових мікроорганізмів у різні агроценози, що перспективно як для фізіологічних показників росту рослин, активізації біологічної системи «ґрунт-рослина-мікробіом», так і для можливості оздоровлення ґрунту, зменшення пестицидного навантаження на довкілля [170, 171].

Дія біологічних препаратів на основі активних ґрунтових штамів мікроорганізмів сприяє синтезу в ґрунті та безпосередньо в самій рослині природних антидепресантів та антистресових факторів стійкості до посухи, перезволоження та інших несприятливих умов навколишнього середовища [211, 212]. Біопрепарати інгібують патогенну мікробіоту і формують у рослин «індуковану систему стійкості» та запобігає розвитку хвороб від фітопатогенних організмів.

Враховуючи сучасні дослідження вчених щодо розуміння взаємозв'язків між ризобактеріями та рослинами, в роботах Poveda, González-Andrés (2021) та Tsotetsi et al. (2022) узагальнено поточну базу знань про ключові метаболіти, що виділяються як бактеріями, так і рослинами, їхню роль у взаємодії між організмами та відповіді на різні екологічні стреси [215, 216].

Через розкриття механізмів формування рослинно-мікробних систем та підсилення їх частки конкурентоздатності до стресових антропогенних факторів відкривається можливість створювати інноваційні наукоємні розробки для



управління біологічними процесами у агроценозах. Отже, селективне формування різноманіття мікробного комплексу ґрунту та ризосфери має значення для підвищення конкурентоспроможності та досліджень складних комплексів фізіологічних особливостей рослин.

#### **4.1 Особливості впливу штамів *Bacillus subtilis* на розвиток *Triticum aestivum* L. у разі застосування інокуляційних культур**

Ріст рослин розглядається як інтегральний процес, який є результатом взаємодії різних факторів середовища з фізіологічними процесами, що протікають у рослинному організмі протягом всього періоду вегетації. Ріст і розвиток рослин пшениці озимої в агроценозі протягом вегетації відбувається в умовах стресу, викликаного патогенними мікроорганізмами, шкідниками та нестабільними гідротермічними умовами, що відповідним чином може відобразитися на формуванні елементів структури врожаю, продуктивності та якості отриманого зерна. Попередніми дослідженнями з'ясовано, що сортова специфічність пшениці озимої значно пов'язана з особливостями формування мікробіому у різні фази росту і розвитку рослин (як інтегральний показник функціональної та метаболічної активності ґрунтових мікроорганізмів). В результаті досліджень показано, що чисельність та склад мікробного комплексу ризосфери пшениці озимої у процесі онтогенезу може значно змінюватися. Загальний пул сапротрофних мікроорганізмів ризосфери продемонстрував варіабельність біомаси та зміни на користь екологопластичних бацил, а саме збільшення чисельності бактерій р. *Bacillus* до  $4,2 \times 10^7$  КУО/г [240]. Сапротрофні мікроорганізми ризосфери змінюються на користь екологопластичних бактерій роду *Bacillus*.

З літературних даних відомо, що біологічна ефективність ґрунтових бактерій значною мірою зумовлена продукуванням фізіологічно активних речовин і метаболітів (гормонів ауксинової, цитокінінової та гібберелінової

природи тощо) [172, 173]. Речовини гормональної природи, синтезовані мікроорганізмами, є позаклітинними, перебувають в культуральній рідині.

Бактерії з роду *Bacillus* на думку вчених виробляють вторинні метаболіти і можуть бути використані як природні інсектициди для біоконтролю патогенів завдяки продукуванню сполук з асептичною активністю, синтезу ферментів, що лізують клітинні стінки грибів, і індукцію системних реакцій у рослин-господарів та мають позитивний вплив на ґрунтову екосистему [217], посилюють ріст та розвиток рослин завдяки продукуванню фітогормонів, збільшують доступність основних поживних речовин (азоту, фосфору, заліза), підвищують рівень етилену за допомогою АЦЦ-дезамінази [218].

Дослідження Li et. al. (2021) показують, що біостимуляція посівів кукурудзи штамом *Bacillus* sp. MGW9 покращує проростання насіння на засолених ґрунтах, збільшує на 7% довжину основного кореня завдяки більшому вмісту хлорофілу, проліну, розчинного цукру, активності супероксиддисмутази, каталази, пероксидази та аскорбатпероксидази, одночасно зменшуючи вміст малонового діальдегіду [219].

У проведених дослідженнях було визначено особливості впливу нових штамів *B. subtilis* на розвиток тест-рослин (проростків пшениці озимої *Triticum aestivum* L.) у разі застосування інокуляційних бактеріальних культур.

Основний принцип при обробці сільськогосподарських рослин мікробними препаратами з рістстимулювальною активністю полягає в необхідності детального дослідження та встановлення фізіологічно доцільного терміну обробки рослин (фази розвитку) та визначення раціонального інокуляційного навантаження при їх внесенні.

В результаті біотестування і вивчення впливу культуральної рідини нових штамів *B. subtilis* на ріст і розвиток рослин пшениці виявлено, що при розведеннях 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 спостерігається стимулювальна дія біоагентів (рис. 4.1).

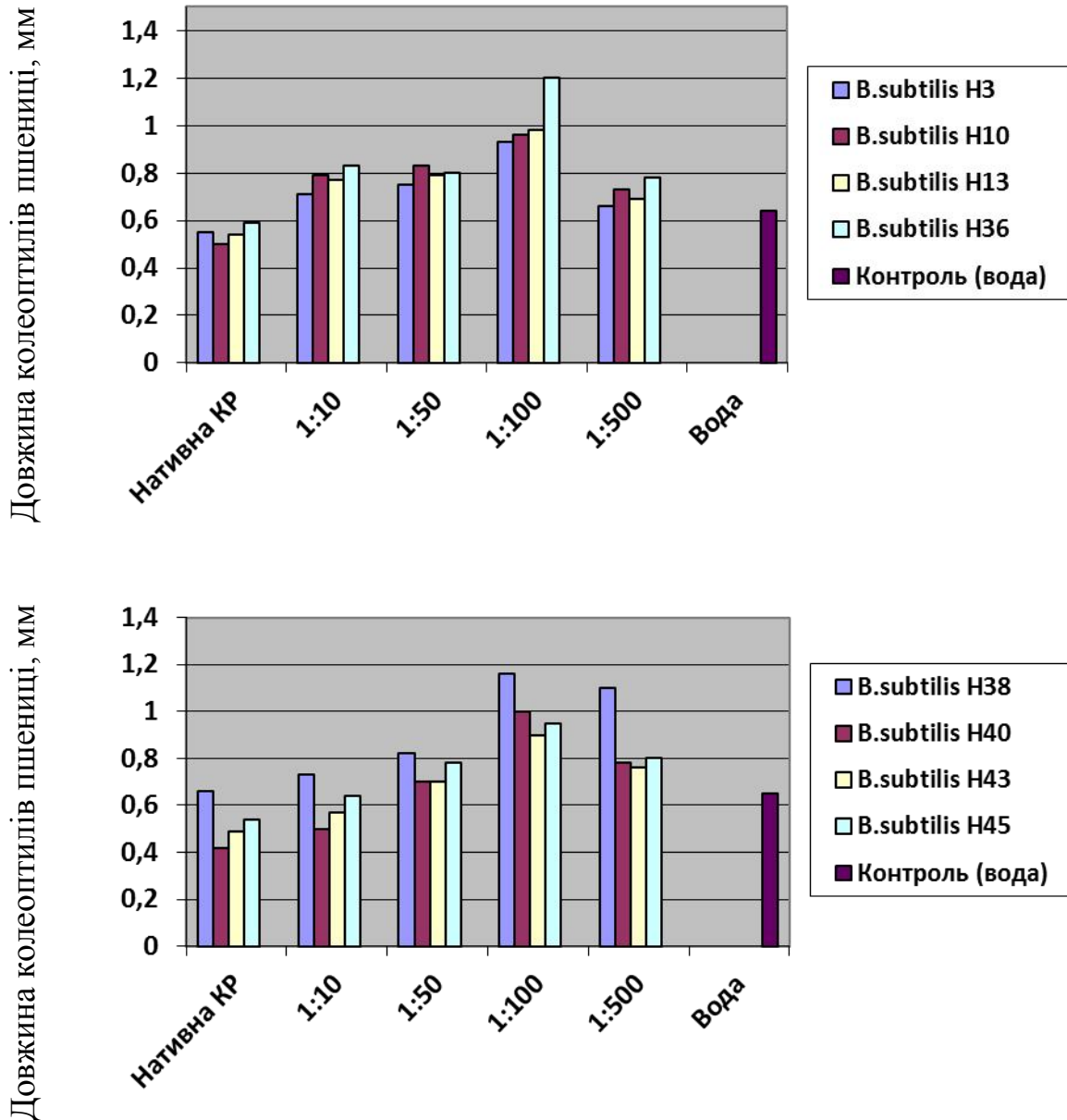


Рисунок 4.1 – Активність фізіологічно активних метаболітів штамів *B. subtilis* та їх вплив на приріст колеоптилів пшениці, 2022-2023 рр.

Так, найменша стимулювальна дія штамів *B. subtilis* H3, H10, H13, H36 проявлялась за розведення культуральної рідини 1:500, а максимальна стимулювальна дія проявилась за використання розведення 1:100. Це підтверджує те, що біологічна ефективність бактерій *B. subtilis* значною мірою зумовлена продукуванням гормонів ауксинової, цитокінінової та гібберелінової природи, а

речовини гормональної природи, які синтезовані мікроорганізмами, є позаклітинними та перебувають безпосередньо в культуральній рідині штамів.

Отже наші дослідження узгоджуються з даними вчених (Accinelli et. al., 2018), де обробка корисними мікроорганізмами *B. subtilis* підвищила довжина пагонів (+7%) і коренів (+10%) за вирощування кукурудзи на зерно. Методом, за якого було отримано позитивний ефект, було включення бактерій у композицію на основі біопластику, а не застосування біоплівки або розведень [220].

У дослідженнях Teixeira et.al. (2021) встановлено позитивний ефект від застосування біостимуляції насіння сої бактеріями, що сприяло підвищенню інтенсивності проростання на 15,0%, довжини коренів на 33% та загальної кореневої маси на 27,0% порівняно з контролем [221].

Отримані результати в цілому позитивні, але мінливі, тому є перспектива щодо збору більшої наукової інформації для різних культур і технологій вирощування, враховуючи різні корисні мікроорганізми (види, штами) та змінні кліматичні умови, щоб зрозуміти вплив обробки насіння.

Встановлено, що нативна культуральна рідина штамів *B. subtilis* H10, H13, H40, H43 і H45 пригнічувала ріст колеоптилів, показник був нижчим за абсолютний контроль на 17,0-35,0%. Отримані результати засвідчують високу активність штамів-продуцентів ауксиноподібних сполук у культуральній рідині та доцільність використання у дослідженнях діагностичного тесту на ауксинову активність екзометаболітів штамів *B. subtilis*.

В цілому, розведення культуральної рідини позитивно впливали на приріст колеоптилів пшениці (див. рис. 4.1), що свідчить про продукування штамами *B. subtilis* фізіологічно-активних сполук у різних концентраціях (прояв стимулювального ефекту). Екзогенне надходження активних метаболітів до рослин за інтродукції *B. subtilis* може сприяти також оптимізації процесів органогенезу, і як результат – підвищенню продуктивності культур.

Варто зазначити, що рідкі форми мікробних препаратів дають можливість застосувати їх за допомогою спеціальних оприскувачів по вегетації рослин у певні фази без проведення додаткових маніпуляцій. Оптимальне поєднання

бактеризації та обробки вегетуючих рослин з урахуванням відповідних норм препарату та термінів здійснення обробок вважається надзвичайно важливим для розробки ефективного способу застосування мікробного препарату.

За науково-теоретичними та практичними результатами досліджень вчених, доведено, що сигнальна взаємодія рослин і мікроорганізмів пов'язана з регуляторними функціями рослин (особливо відносно швидкості розмноження і чисельності клітин бактерій). Така регуляція дуже важлива тому, що потенційна швидкість розмноження і метаболічна активність у бактеріальних клітин значно вища, ніж у рослинних. Тому взаємодія рослин і мікроорганізмів являє собою комплекс процесів, які реалізуються через молекулярні механізми та метаболічні інтеграції [174, 175].

Відомо, що морфометричні показники росту і розвитку культурних рослин істотно не змінюються в залежності від способу застосування мікробних препаратів як при обробці культуральною рідиною штаму-продуценту, так і супернатантом культуральної рідини бактерій [1, 166]. Вченими різних країн світу показано, що такі обробки в однаковій мірі сприяють підвищенню біометричних параметрів культури. Крім цього, формування ростових параметрів сільськогосподарських рослин залежить від норми застосування мікробного препарату. Мікробіологічна регуляція ростових процесів є дієвим засобом підвищення стійкості культурних рослин до несприятливих факторів середовища та підвищення продуктивності сільськогосподарських культур [222] за рахунок мобілізації потенційних можливостей рослинного організму.

Дослідження Lastochkina et.al. (2021) підтверджують наші результати (див. рис. 4.1) і доводять захисну дію *Bacillus subtilis* (штам 10-4) проти посухового стресу [223]. Бактерія була застосована за допомогою біопраймінгу на насінні пшениці, яке було чутливим (*T. aestivum* cv. *Salavat Yulaev*) або толерантним (cv. *Ekada* 70) до умов посухи під час фази проростання. *B. subtilis* сприяв проростанню та росту рослин 6-денної розсади (як довжини, так і свіжої/сухої маси коренів і пагонів) за нормальних умов росту та швидко активував специфічні

метаболичні адаптації до стресових умов посухи шляхом зниження перекисного окислення ліпідів, вмісту проліну та витік електроліту у 21-денних проростків.

В результаті проведених досліджень визначено комплексні параметри стимулювання бактерій *B. subtilis* через аналіз показників проростання тест-культури *Triticum aestivum* L., а саме: енергію, схожість, швидкість та дружність проростання, а також масу проростків та масу коріння (з розрахунку навантаження клітин на насінину). Найбільший позитивний вплив на проростання насіння пшениці мали інокулянти *B. subtilis*, які наносили на насіння у зрілих технологічних формах (спорова культура) та із розрахунку  $2,0 \times 10^7$  клітин на насінину (табл. 4.1).

Позитивний ефект мікробних препаратів на основі *Bacillus subtilis* sp. на біометричні показники рослин пшениці озимої також відзначено у працях інших авторів [176, 177]. В роботах низки авторів описується позитивна дія як синтетичних стимуляторів росту [224], так і мікробних препаратів з рістстимулюючою дією [225] на ріст і розвиток рослин. Проте мікробні препарати, як правило використовують класичним способом, а саме для бактеризації насіння.

Лабораторна схожість насіння пшениці озимої становила понад 92,5% та мала тенденцію до активного формування майбутніх проростків і коренів. В цілому, схожість тест-культури відповідала вимогам до посівного матеріалу. Невелике зниження в умовах рулонного методу схожості насіння компенсується швидким його проростанням, більш високим індексом утворення проростків та відносно кращою швидкістю росту і розвитку.

Енергія проростання насіння пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) підвищується при використанні бактерій-інокулянтів *B. subtilis* до 96,5%. Слід зазначити, що у разі застосування спороутворюючих бактерій відбувається активізація росту первинних коренів рослин пшениці озимої та в цілому збільшення довжини кореневої системи (на 6,3-16,5% відповідно, порівняно з варіантом без обробки штамами).

Таблиця 4.1 – Біометричні показники проростання тест-культури *Triticum aestivum* L. за дії інокуляційних культур спороутворюючих бактерій *B. subtilis*, модельний дослід, 2022-2023 рр.

Варіант досліджу	Енергія проростання, %	Довжина кореневої системи, см	% до контролю	Довжина проростків, см	% до контролю
за використання вегетативних клітин					
Контроль (обробка водою)	89,0±1,4	12,7±1,9	–	9,8±2,6	–
<i>B. subtilis</i> H3	90,2±2,8	13,6±1,9	107,0	9,0±2,0	91,8
<i>B. subtilis</i> H10	90,6±2,4	12,0±1,9	94,5	8,6±2,1	87,8
<i>B. subtilis</i> H13	90,0±2,8	12,2±1,7	96,1	8,3±2,0	84,7
<i>B. subtilis</i> H36	90,0±2,8	14,3±1,6	112,6	10,4±1,6	106,1
<i>B. subtilis</i> H38	89,3±1,4	14,0±1,6	110,2	8,5±2,0	86,7
<i>B. subtilis</i> H40	89,7±1,4	12,8±1,9	100,8	9,6±2,0	98,0
<i>B. subtilis</i> H43	90,5±2,8	13,0±1,7	102,4	11,5±3,5	117,3
<i>B. subtilis</i> H45	91,0±2,4	14,0±1,6	110,2	11,2±3,5	114,3
за використання зрілої спорової культури					
<i>B. subtilis</i> H3	90,7±2,8	14,3±1,6	112,6	11,8±1,9	120,4
<i>B. subtilis</i> H10	96,0±1,5	14,8±1,7	116,5	11,5±1,6	117,3
<i>B. subtilis</i> H13	96,4±1,5	13,7±1,9	107,9	11,6±1,6	118,4
<i>B. subtilis</i> H36	96,5±1,5	14,1±1,1	111,0	12,0±1,8	122,4
<i>B. subtilis</i> H38	96,2±1,5	13,8±1,9	108,7	12,3±2,0	125,5
<i>B. subtilis</i> H40	90,7±2,8	13,5±2,3	106,3	10,3±1,6	105,1
<i>B. subtilis</i> H43	93,5±3,8	14,3±1,6	112,6	12,0±1,8	122,4
<i>B. subtilis</i> H45	91,7±2,4	14,5±1,6	114,2	12,2±3,5	124,5

Обробка біотесту інокуляційними культурами *B. subtilis* призводила до збільшення сирової маси проростків на 84,0-109,6% залежно від варіанту досліджу

порівняно з контролем (табл. 4.2), що свідчить про рістстимулювальні властивості нових штамів.

Таблиця 4.2 – Вплив інокуляційних культур *B. subtilis* на сиру масу проростків і коренів *Triticum aestivum* L.

Варіант досліджу	Сира маса коренів, мг	% до контролю	Сира маса проростків, мг	% до контролю
за використання вегетативних клітин				
Контроль (обробка водою)	85,0 $\pm$ 3,6	–	103,5 $\pm$ 6,3	–
<i>B. subtilis</i> H3	75,0 $\pm$ 10,4	88,2	110,0 $\pm$ 4,1	106,3
<i>B. subtilis</i> H10	55,5 $\pm$ 4,5	65,3	89,0 $\pm$ 18,0	86,0
<i>B. subtilis</i> H13	56,0 $\pm$ 4,5	65,9	87,3 $\pm$ 18,4	84,0
<i>B. subtilis</i> H36	76,0 $\pm$ 7,4	89,4	104,8 $\pm$ 6,0	100,5
<i>B. subtilis</i> H38	89,0 $\pm$ 3,4	104,7	102,7 $\pm$ 5,8	99,2
<i>B. subtilis</i> H40	87,5 $\pm$ 14,4	102,9	102,5 $\pm$ 5,5	99,0
<i>B. subtilis</i> H43	76,4 $\pm$ 7,0	89,9	108,5 $\pm$ 5,1	104,8
<i>B. subtilis</i> H45	94,0 $\pm$ 9,8	110,6	107,8 $\pm$ 8,6	104,2
за використання зрілої спорової культури				
<i>B. subtilis</i> H3	76,3 $\pm$ 7,0	89,8	110,2 $\pm$ 4,0	106,5
<i>B. subtilis</i> H10	75,8 $\pm$ 11,1	89,2	105,3 $\pm$ 6,6	101,7
<i>B. subtilis</i> H13	79,0 $\pm$ 5,7	92,9	105,5 $\pm$ 6,6	101,9
<i>B. subtilis</i> H36	83,2 $\pm$ 3,6	97,9	113,0 $\pm$ 4,1	109,2
<i>B. subtilis</i> H38	90,0 $\pm$ 9,6	105,9	113,4 $\pm$ 4,1	109,6
<i>B. subtilis</i> H40	89,1 $\pm$ 3,4	104,8	106,0 $\pm$ 5,1	102,4
<i>B. subtilis</i> H43	80,3 $\pm$ 3,7	94,5	110,5 $\pm$ 4,0	106,8
<i>B. subtilis</i> H45	94,6 $\pm$ 5,9	111,3	110,0 $\pm$ 4,1	106,3



Отримані дані свідчать про біологічні особливості дослідних штамів *B. subtilis*, які пов'язані з формуванням ефективних рослинно-мікробних взаємодій через обмін екзометаболітами. Механізми взаємодії бактерій з рослинами контролюються з боку обох партнерів і забезпечують їм взаємну користь. Результатом подібної взаємодії виявляється стимуляція росту і розвитку рослини та стабілізація її продукційного процесу.

Відомо, що при інокуляції рослин цитокінін-синтезувальними бактеріями стимулюється накопичення біомаси як пагонів, так і коренів рослин. За проведеними дослідженнями встановлено, що маса коренів за використання культур *B. subtilis* у формі вегетативних клітин (штамів *B. subtilis* Н3, Н10, Н13, Н36, Н43) виявилася меншою на 11,8-44,0% порівняно з контролем. За використання зрілої спорової культури *B. subtilis* (*B. subtilis* Н38, Н40 і Н45) відмічено зростання маси коренів на 4,8-11,3% порівняно з контрольним варіантом без бактеризації. Отже, вплив досліджуваних штамів-інокулянтів на масу первинних коренів тест-рослин мав неоднаковий характер, а бактеризація *Triticum aestivum* L., в цілому, сприяє кращому розвитку кореневої зони тест-рослин (що може в подальшому впливати на активацію адсорбційної здатності коренів до поглинання поживних речовин з субстратного середовища, ґрунту).

Узагальнюючі результати досліджень, можна зазначити, що нові штами *B. subtilis* у вигляді інокуляційних культур позитивно вплинули на розвиток пшениці озимої *Triticum aestivum* L., що свідчить про продукування біоагентами позаклітинних речовини гормональної природи у різних концентраціях, так званий прояв стимулювального ефекту. Зрілі технологічні форми інокулянтів *B. subtilis* прискорювали проростання насіння пшениці та активізували ріст первинних коренів рослин і формування їх кореневої системи. Рістстимулювальні властивості нових штамів *B. subtilis* підтверджено також через показники збільшення біомаси як проростків, так і коренів рослин.

Сигнальна відповідь рослин на бактеріальні інокулянти в умовах *in vivo* залежить від ряду факторів середовища, у т.ч. генотипу рослин, що може суттєво знижувати ефективність їх практичного використання. Але передпосівна обробка

насіння на сьогодні залишається найбільш доступним і ефективним агрозаходом. Оскільки рослинно-мікробна взаємодія (колонізація ризосфери, філоплани рослин; продукування антимікробних метаболітів, фізіологічно-активних, фітогормональних речовин ауксинової, гіберелінової, цитокінінової природи та вітамінів; індукція системної стійкості у рослині тощо) розглядається як важливий механізм біологічного контролю агросистем.

В результаті досліджень показано, що отримані дані на рівні модельного тестування біоагентів *B. subtilis* на рослинах пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) дозволяють виявити позитивний вплив інокулянтів, пов'язаний з основними показниками росту і розвитку рослин та прослідкувати стимулювальний ефект за використання оптимальних розведень культуральної рідини. Екзогенне надходження активних метаболітів до рослин за інтродукції штамів *B. subtilis* дає можливість оптимізувати процеси органогенезу. Встановлено, що при розведеннях 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 спостерігається стимулювальна дія біоагентів: від мінімальної (штами *B. subtilis* НЗ, Н10, Н13, Н36 у разі розведення культуральної рідини 1:500, до максимальної стимулювальної дії при розведенні 1:100). Отже, біологічна ефективність штамів *B. subtilis* значною мірою зумовлена продукуванням екзометаболітів, які зосереджуються у культуральній рідині. При цьому нативна культуральна рідина штамів *B. subtilis* Н10, Н13, Н40, Н43 і Н45 пригнічує ростові процеси, що свідчить про активізацію продуцентів ауксиноподібних сполук у культуральній рідині. При аналізі ефективності рослинно-мікробної взаємодії у разі інокуляції різними технологічними культурами *B. subtilis* показано доцільність застосування зрілих спорових культур *B. subtilis* ( $2,0 \times 10^7$  клітин на насінину), що дає можливість прояву рістстимулювальних властивостей нових штамів, зокрема за показниками сирії маси проростків і коренів *Triticum aestivum* L. Таким чином, розширено знання щодо особливостей впливу нових штамів *B. subtilis* на розвиток пшениці озимої як перспективних інокулянтів з ефектом ріст стимуляції.

Пошук нових штамів-продуцентів з захисно-стимулюючою дією та вивчення їх особливостей впливу на рослинний організм є перспективним

науковим напрямом. Це дозволить виявити нові закономірності життєдіяльності спороутворюючих бактерій та їх роль у живленні культурних рослин, а також є необхідним для удосконалення мікробних інокулянтів з метою підвищення їх технологічності й ефективності при застосуванні у сучасних технологіях вирощування сільськогосподарських культур.

#### **4.2. Вплив бактеріальних інокулянтів *Bacillus subtilis* на фотосинтетичний апарат рослин пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.).**

Застосування біопрепаратів на основі технологічних штамів *B. subtilis* в сучасних умовах розвитку аграрного виробництва привертає велику увагу, в основному, за рахунок своєї екологічності, підвищення розкриття природного потенціалу рослинно-мікробних систем і, в кінцевому рахунку, отримання оптимальної кількості органічної продукції рослинного походження. Отже, потреба в мікробних препаратах для рослинництва, землеробства буде зростати щорічно (як для вітчизняних впроваджень в інтегровані технології сільського господарства, так і на рівні застосування в фермерських органічних агровиробництвах, у тому числі господарствах європейських країн).

Узагальнені літературні дані про властивості ризосферних мікроорганізмів дозволяють на сьогодні комплексно визначати їх рістстимулюючий потенціал, а також регуляторний вплив на різних етапах онтогенезу рослин, формування і функціонування мікробних популяцій ризосфери [202, 203].

Встановлено, що за дії бактерій–продуцентів фітогормонів можуть відбуватися зміни ендогенного гормонального балансу рослин [204-206]. Крім цього, поліпшення ростових параметрів макроорганізму, особливо в умовах стресу, можливо через вплив ґрунтових бактерій на архітектуру кореневої системи культурної рослини (довжину, площу поверхні, об'єм кореня), а також поглинальну здатність кореня. Ріст і розвиток рослин пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) в агроценозі протягом вегетації відбувається в умовах стресу, викликаного патогенними мікроорганізмами, шкідниками та нестабільними

гідротермічними умовами, що відповідним чином може відображатися на формуванні елементів структури врожаю, продуктивності та якості отриманого зерна. Відомо, що одним з важливих стресових чинників для пшениці озимої є її перезимівля. Оцінка стану входу в зиму рослин пшениці за допомогою вимірювання індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ) – програмного забезпечення побудови кривої флуоресценції хлорофілу (крива Каутського) – дозволяє оцінити активність роботи фотосистеми та зробити попередній прогноз продуктивності, спланувати забезпечення рослин протягом вегетаційного періоду необхідними елементами живлення, засобами захисту рослин, стимуляторами росту для оптимального використання наявних ресурсів. Крім цього, дослідження кінетики флуоресценції надає важливу інформацію, що стосується характеру активності певного фактора зовнішнього середовища щодо впливу на параметри фотосинтезу. Отриману інформацію можна використовувати для екологічного моніторингу, а також для оцінювання стійкості рослин.

На сьогодні роботами вчених показано, що бактеризація ґрунтовими мікроорганізмами у вигляді різних препаративних форм позитивно впливає на біометричні показники рослин (висоту, довжину рослин, формування кореневої системи) та біомасу [207, 208]. Широкий спектр біологічно активних речовин (білки, вітаміни, фітогормони, екзополісахариди, низькомолекулярні сполуки – органічні кислоти, амінокислоти) розглядають як основні складові при дослідженнях механізму дії ґрунтових мікроорганізмів в агроценозах. Тому дослідження біологічної активності бацил при створенні мікробних препаратів широкого спектру дії для рослинництва є досить актуальними. Порівняно з іншими культурами мікроорганізмів, бацилярні більш стійкі до несприятливих умов навколишнього середовища, що надає їм переваги у застосуванні. Таким чином, використання біологічних агентів мікробних препаратів у рослинництві, землеробстві вважається доцільним агробіотехнологічним прийомом.

Проведені дослідження з оцінки впливу бактеріальних інокулянтів *B. subtilis* на фотосинтетичний апарат тест-рослин пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) дозволили спочатку виявити рівень життєздатності штамів *B. subtilis* Н38, Н40,

H45 та активність спороутворення в поживному рідкому середовищі LB при глибинному культивуванні протягом трьох діб.

Показано позитивну динаміку формування спор та стабільність вихідного титру після 60 діб зберігання при температурі не вище 18-20°C. Досліджувані штами *B. subtilis* характеризувались активним формуванням спор (1,89-2,43 млрд./мл КР) та швидкістю продукування екзометаболітів в інтервалі рН ферментаційного середовища від 6,0 до 8,0, табл. 4.3.

Таблиця 4.3 – Аналіз формування технологічності штамів *B. subtilis* при ферментації та зберіганні культуральної рідини (лабораторні умови)

Штам	Вихідна технологічна активність (титр спор через 72 години), млрд. спор/мл	рН			Титр спор після зберігання за кімнатної температури, млрд. спор/мл		
		24 год.	48 год.	72 год.	20 діб	40 діб	60 діб
<i>B. subtilis</i> H38	1,89	6,2	7,0	7,6	1,86	1,83	1,81
<i>B. subtilis</i> H40	2,27	6,0	7,5	8,0	2,25	2,22	2,20
<i>B. subtilis</i> H45	2,43	6,0	7,2	7,8	2,40	2,35	2,33

Динаміка зберігання титру спор КР *B. subtilis* протягом 60 діб демонструє стабільні показники в межах оптимальних інокуляційних навантажень, зокрема не менше 1,5 млрд. спор/мл. Таким чином, підтверджена технологічність штамів *B. subtilis* H38, H40 і H45 та перспективність їх використання в якості ефективних інокулянтів (наприклад, для тестування фітостимуляційних, регуляторних властивостей мікробного агента або перебігу фотохімічної активності рослин в процесі онтогенезу та інше).

Досліджено фотохімічну активність проростків пшениці озимої за допомогою біофізичного методу індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ). Оцінка функціонального стану тест-рослин за аналізом змін ІФХ, що являє собою процес

реємісії світла та характеризується чутливістю до змін у фотосинтезі, дозволила визначити вплив бактеріальних інокулянтів *B. subtilis* Н38, Н40, Н45 за різних розведень на окремі показники та коефіцієнти перебігу світлових фаз фотосинтезу та ефективність фотохімічних процесів.

Так, у модельних умовах вплив КР штамів *B. subtilis* Н38, Н40, Н45 призвів у рослин різні за інтенсивністю та спрямованістю ІФХ (рис. 4.2).

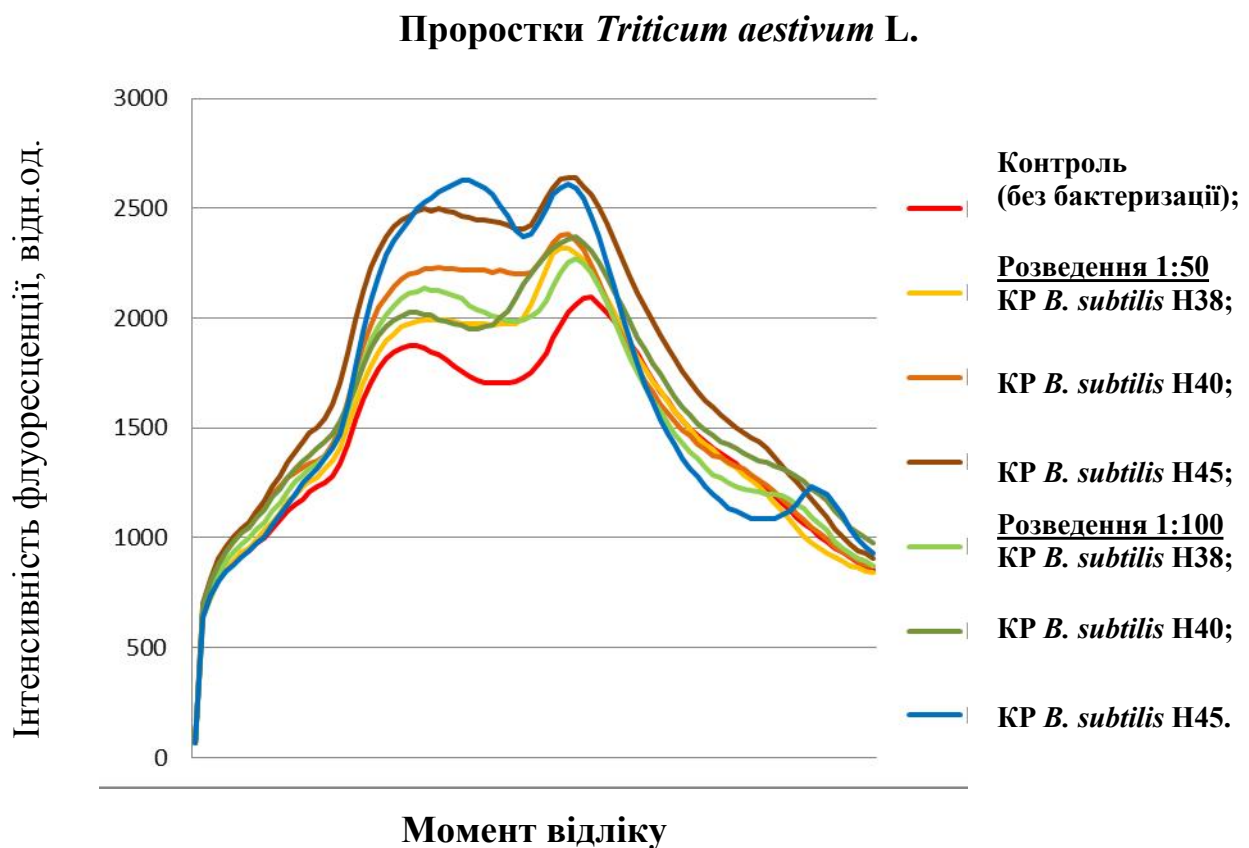


Рисунок 4.2 – Визначення інтенсивності флуоресценції хлорофілу (ІФХ) в проростках пшениці озимої під впливом культуральної рідини штамів *B. subtilis* (індукційна крива)

Для проростків пшениці озимої спостерігається незначні коливання «фонового» рівня індукції флуоресценції, які зафіксовані у межах 736 – 944 відносних одиниць еталону флуоресценції (світлофільтр ОС-14). У варіантах зі штамми *B. subtilis* Н40 та *B. subtilis* Н45 даний показник збільшується порівняно

зі штамом *B. subtilis* H38 на 8,0-13,2% (при розведенні КР 1:50), а також на 3,5-6,8% (при розведенні КР 1:100), табл. 4.4.

Таблиця 4.4 – Параметри ІФХ пшениці озимої за ефектом дії штамів *B. subtilis* (модельний дослід)

Варіант досліду	Показники світлової індукції, $\lambda = 680$ нм						
	$F_0$	$F_{pl}$	$F_{max}$	$F_{st}$	$F_{max}-F_0$ ( $F$ варіабельна)	$K_1$	$R_{fd}$
Контроль (без бактеризації)	656	1232	2064	928	1408	0,68	1,52
Розведення КР <i>B. subtilis</i> 1:50							
<i>B. subtilis</i> H38	736	1312	2288	960	1552	0,68	1,62
<i>B. subtilis</i> H40	800	1272	2344	992	1544	0,66	1,56
<i>B. subtilis</i> H45	848	1504	2608	1040	1760	0,67	1,69
Розведення КР <i>B. subtilis</i> 1:100							
<i>B. subtilis</i> H38	880	1280	2208	1104	1328	0,60	1,20
<i>B. subtilis</i> H40	912	1312	2360	1152	1448	0,61	1,26
<i>B. subtilis</i> H45	944	1248	2624	1200	1680	0,64	1,40

Оскільки показник  $F_0$  залежить від втрат енергії збудження при її міграції по пігментній матриці світлозбиральних комплексів, то за отриманими показниками вимірювань спостерігається тенденція щодо збільшення кількості хлорофілів, які не активні при фотосинтетичному переносі енергії на реакційні центри. У контрольному варіанті показник  $F_0$  має найменше значення, що свідчить про відповідне зменшення втрати енергії під час її міграції.

Отже, за результатами отриманих даних можна засвідчити, що при використанні КР *B. subtilis* відбувається ефективніше використання поглинутого світла проростками тест-рослин пшениці та зменшення цієї ефективності без бактеризації.

Для тест-рослин пшениці озимої найвищий рівень флуоресценції хлорофілу *a* змінюється у досліді в діапазоні 2064-2624 відносних одиниць. Значне зменшення цього показника ( $F_{\max}$ ) порівняно з умовами інокуляції мікробними агентами можна пов'язувати з модифікаціями у структурі та кількості хлоропластів. У ході досліджень виявлено, що параметр  $K_1$  як частка хлорофілів, що беруть участь у фотосинтезі, не перевищує 0,60-0,68, що свідчить про ефективність світлової фази процесу (високу частку активних хлорофілів, незалежно від умов середовища, субстрату при вегетації рослин). При цьому, індекс життєздатності  $R_{fd}$  у всіх досліджуваних варіантах входить у нормальну квантову ефективність фотосинтезу (тобто  $R_{fd} \geq 1,50-2,50$ ).

Таким чином, за результатами проведених досліджень з тест-рослинами пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) встановлено варіабельність показників інтенсивності флуоресценції хлорофілу при використанні розведень культуральної рідини перспективних штамів *B. subtilis*. За побудованими індукційними кривими флуоресценції хлорофілу (ІФХ) в дослідних рослинах пшениці прослідковується ідентичність форм графіків за варіантами бактеризації штамами *B. subtilis* Н38, Н40, Н45.

#### Висновки до розділу 4

Узагальнюючи результати модельного досліду з впливу культуральних рідин штамів *B. subtilis* за різних технологічних форм і розведень на ріст і розвиток тест-рослин пшениці, встановлено, що при розведеннях 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 спостерігається стимулювальна дія біоагентів, а максимальний ефект досягається при розведенні 1:100.

Показано, що найбільший позитивний вплив на проростання насіння пшениці мали інокулянти *B. subtilis*, які наносили на насіння у зрілих технологічних формах (спорова культура,  $2,0 \times 10^7$  клітин на насінину). Енергія проростання насіння *Triticum aestivum* L. підвищується при взаємодії з інокулянтами *B. subtilis* до 96,5%, а також збільшується сира маса проростків на



84,0-109,6% залежно від варіанту досліду порівняно з контролем, що свідчить про рістстимулювальні властивості нових штамів.

Доведено, що за використання зрілих спорових культур *B. subtilis* Н38, Н40 і Н45 відбувається зростання маси коренів на 4,8-11,3% порівняно з контролем без бактеризації. При обробці культуральними рідинами штамів *B. subtilis* Н3, Н10, Н13, Н36, Н43 у формі вегетативних клітин маса коренів зменшується на 11,8-44,0% порівняно з контролем.

Таким чином, бактеризація агрономічно цінними ґрунтовими мікроорганізмами *B. subtilis* позитивно впливає на біометричні показники рослин. Тому для раціонального використання потенціалу регуляторних (сигнальних) рослинно-мікробних взаємодій необхідно звертати увагу не лише на ефективність нових штамів та їх сумісність, але й знати, за яких умов штами-інокулянти можуть успішно конкурувати з представниками ґрунтових популяцій специфічних бактерій та колонізувати кореневу систему рослин.

Отримані дані демонструють стабільну технологічну активність штамів *B. subtilis* Н38, Н40, Н45 як при глибинному культивуванні в рідкому середовищі LB до 72 годин (титр спор від 1,89 до 2,43 млрд. спор/мл КР), так і при подальшому зберіганні КР упродовж 60 діб в температурному діапазоні 18-20°C (титр спор стабільний в межах 1,81-2,33 млрд. спор/мл відповідно).

Проведені дослідження дозволили оцінити вплив бактеріальних інокулянтів *B. subtilis* на фотосинтетичний апарат тест-рослин пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) в лабораторних умовах, а також виявити високу інформативність індукційних змін флуоресценції хлорофілу (ІФХ) у структурній організації хлоропластів проростків пшениці за комплексом параметрів, зокрема на початковому, максимальному, стаціонарному рівнях флуоресценції та індексу життєздатності. У варіантах з бактеризацією технологічними штамами *B. subtilis* зі різних розведень встановлено ефективність фотосинтезу в оптимальних межах (індекс життєздатності  $R_{fd}$  відповідає нормальним показникам квантової ефективності фотосинтезу ( $\geq 1,50$ -2,50)). Таким чином, штами *B. subtilis* продемонстрували активізацію використання поглинутого світла проростками

тест-рослин пшениці в модельних умовах та перспективність бактеризації для зернових культур. Доведено перспективність використання бактеріальних інокулянтів *B. subtilis* в аспекті фотохімічної активності рослин пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) в процесі онтогенезу, що має науково-практичне значення для екологічного моніторингу, оцінки стійкості рослин та впровадження біологічних засобів у технологіях вирощування сільськогосподарських культур.

**РОЗДІЛ 5****СПЕКТР МІЖМІКРОБНОЇ ВЗАЄМОДІЇ БАКТЕРІЙ *BACILLUS SUBTILIS*  
З ФІТОПАТОГЕННИМИ ОРГАНІЗМАМИ****5.1 Оцінка антагоністичних властивостей бактерій *Bacillus subtilis***

Сучасний сортовий асортимент сільськогосподарських культур характеризуються високим біологічним потенціалом урожайності, але його реалізація на практиці не перевищує 40,0-50,0%. Однією із причин цього факту є ураження рослин хворобами. Тому, виходячи з безпеки, яку можуть спричинити фітопатогенні організми, існує необхідність у розробці ефективних та превентивних заходів попередження їх розвитку. Найбільш екологічним та економічно вигідним заходом обмеження шкідливості та мінімізації частоти хвороб є впровадження у виробництво мікробних препаратів на основі штамів-антагоністів у системі інтегрованого захисту рослин.

Пошук штамів-антагоністів, активних проти різноманітного спектру фітопатогенних бактерій та мікроміцетів, а також розроблення на їх основі мікробних препаратів для захисту рослин залишається важливим завданням за напрямом сільськогосподарської мікробіології та біотехнології. В цьому питанні, базуючись на літературних та експериментальних даних вчених, доведена перспективність використання представників *Bacillus subtilis*, які здатні проявляти високу антагоністичну та антифунгальну активність до широкого спектру патогенних і умовно-патогенних бактерій та мікроміцетів [99, 107, 145].

Відомо, що фітопатогени уражають рослини, колонізуючи їх поверхню або тканини. Інфікування супроводжується широким спектром ознак, які у кінцевому результаті призводять до старіння, загнивання та загибелі рослин. Представники родів *Fusarium*, *Aspergillus* синтезують мікотоксини, зокрема канцерогенні, що погіршують якість зерна. Фітопатогенні бактерії спричиняють важкі бактеріальні інфекції, які важко контролювати. Їхні симптоми – плямистість, рак, гниль, гормональний дисбаланс, що призводить до надмірного росту рослин або його затримки. Серед фітопатогенних бактерій найпоширеніші інфекційні захворювання спричиняю

ть *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Pectobacterium carotovorum*, *Clavibacter michiganensis* та інші.

Дослідження біологічних препаратів свідчать про широке застосування біопрепаратів на основі ґрунтових мікроорганізмів через їх комплексну дію проти фітопатогенних агентів різних родів. Але більшість мікробних препаратів мають спеціалізовану (вузьку) дію на окрему групу фітопатогенних організмів – збудників грибних або бактеріальних хвороб рослин.

До збудників хвороб, що уражують рослини пшениці озимої у ранні фази розвитку належать кореневі гнилі, зокрема звичайна фузаріозна, офіобольозна, церкоспорельозна; хвороби періоду перезимівлі – снігова пліснява і склеротиніоз; хвороби, що виявляються та інтенсивно розвиваються в період від сходів до молочної стиглості зерна – борошниста роса, септоріоз; хвороби періоду фенофаз трубкування-молочно-воскова стиглість зерна – бура, стеблова, жовта іржа; періоду цвітіння – молочно-воскова стиглість зерна – фузаріоз колосу, альтернаріоз, гелмінтоспоріоз, летюча і тверда сажки, оливкова пліснява, чорний плямистий і базальний бактеріози. Відомо, що впродовж вегетаційного періоду рослин фітопатогенні мікроміцети можуть формувати не одну генерацію конідіального спороношення, що призводить до накопичення їхніх спор на вегетативних органах рослин та сприяє поширенню фітопатогенів в агроценозах.

В блоці проведених експериментів нами встановлено, що за спектром антагоністичної активності нові штами *B. subtilis* Н38, Н40 виявилися високоактивними відносно тестових фітопатогенних бактерій та мікроміцетів. Так, штаму *B. subtilis* Н38 (табл. 5.1), на відміну від штамів Н10, Н36, пригнічував розвиток *Pectobacterium carotovorum* 8982.

Максимально чутливим до штамів *B. subtilis* Н38, Н40 виявився тест-штам *Xanthomonas campestris* 8003б (зона затримки росту спостерігалася в межах 33,0-37,0 мм). А тест-штами фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae* та

*Xanthomonas campestris* виявились не чутливими до штаму *B. subtilis* IMB B-7516, обраного як контрольний.

Таблиця 5.1 – Антагоністична активність штамів *B. subtilis* щодо фітопатогенних бактерій

Тест-штами мікроорганізмів	Штами з антагоністичними властивостями				
	<i>B. subtilis</i> H10	<i>B. subtilis</i> H36	<i>B. subtilis</i> H38	<i>B. subtilis</i> H40	<i>B. subtilis</i> IMB B- 7516 (контроль)
	зона затримки росту, мм				
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9400	20,0	18,0	22,0	21,0	0
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 8511	16,0	14,0	26,0	24,0	0
<i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> 80036	18,0	20,0	37,0	30,0	0
<i>Pectobacterium</i> <i>carotovorum</i> 8982	0	0	23,0	21,0	21,0

У ході досліджень штами *B. subtilis* H10, *B. subtilis* H36 проявляли середню активність щодо біотестів-фітопатогенів, зокрема зони затримки не перевищували 20,0 мм.

З огляду на отримані результати серед досліджуваних штамів *B. subtilis* є перспективні продуценти антимікробних екзометаболітів з досить широким спектром антагоністичної активності.

Слід зазначити, що продукція антимікробних сполук може активно виражатися у штамів бацил під час їх періодичного культивування у технологічних поживних середовищах (наприклад, на третю або п'яту добу) та, відповідно, оцінюватися за показником інгібування росту тест-мікроорганізму. Так, при оцінці впливу метаболітів штамів *B. subtilis* (їх надосадової рідини) на

ріст тест-культур фітопатогенних організмів виявлено різний рівень антагоністичної активності (зони затримки росту враховували через 10 діб культивування, табл. 5.2).

Таблиця 5.2 – Вплив метаболітів штамів *B. subtilis* на ріст тест-культур фітопатогенних мікроміцетів

Надосадова рідина штаму	Зона затримки росту тест-мікроорганізму (мм) в залежності від накопичення метаболітів при періодичному культивуванні штаму (год.)	
	72 години	120 годин
Термотолерантний мікроміцет <i>Fusarium sporotrichioides</i> Sherb. 23.2, який активно росте та спорулює за температури 26–32°C		
<i>B. subtilis</i> H10	16-18	14-16
<i>B. subtilis</i> H36	16-18	12-13
<i>B. subtilis</i> H38	16-18	15-16
<i>B. subtilis</i> H40	24-25	20-22
<i>B. subtilis</i> IMB B-7516	18-20	15-16
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. 3.45		
<i>B. subtilis</i> H10	10-13	8-9
<i>B. subtilis</i> H36	12-14	6-8
<i>B. subtilis</i> H38	12-14	9-11
<i>B. subtilis</i> H40	16-17	12-14
<i>B. subtilis</i> IMB B-7516	14-16	11-12

Відомо, що фузаріоз і фузаріозне в'янення знижує урожайність сільськогосподарських культур на 30,0-40,0% та викликається низкою мікроміцетів з роду *Fusarium*. Джерелом інфекції є насіння і рослинні рештки, а біологія представників роду *Fusarium* зумовлена умовами середовища існування. Мікроміцети р. *Fusarium* характеризується добре розвиненим міцелієм (спочатку пухнастим білим, а пізніше через 7-10 днів колір змінюється від бежевих відтінків

до насичених оливкових кольорів). Знизу колонії мають різне забарвлення (жовте, темно-коричневе).

Як показали спостереження, *Fusarium* spp. уражує як наземну, так і кореневу систему рослин. Спочатку уражуються сходи, потім симптоми з'являються на всіх частинах рослин: коренях, листах. Корені уражених рослин розвиваються слабо, рослини легко вириваються та відстають у рості та розвитку. У наземній частині фузарій найчастіше викликає гниль стебла. Уражуються також репродуктивні органи рослини. Корені гниють з коричневими або чорними епідермальними тканинами і червонуватим або коричневим забарвленням судин, поширюючись на інші частини рослини. Симптоми листя включають міжжилковий хлороз, передчасну дефоліацію та в'янення. Таким чином, фузаріоз зерна за багатьма аспектами є унікальним захворюванням рослин, що й зумовлює значні труднощі його вивчення. Однією з таких особливих рис є специфічна етіологія, а саме участь у патогенезі комплексу представників різних видів *Fusarium*.

У проведених дослідженнях показано, що досліджені надосадові рідини штамів *B. subtilis* проявляли середню антагоністичну активність щодо екологічно пластичного тест-мікроміцету *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2, який здатний до синтезу тріхотеценових токсинів. Так, зона пригнічення росту мікроміцету складала від 16 до 18 мм у варіантах з 72-годинним періодичним культивуванням бактерій. Штам *B. subtilis* H40 відрізнявся від інших дослідних культур та проявив високу активність (зона пригнічення росту мікроміцету в межах 24-25 мм). Вже на десяту добу експерименту (у варіантах при 120 годинах культивування штамів *B. subtilis*) антагоністична активність надосадової рідини *B. subtilis* H10, *B. subtilis* H36, *B. subtilis* H38, *B. subtilis* H40 та *B. subtilis* IMB B-7516 поступово зменшувалась, але не входила в групу слабкої активності (рівень не менше 12 мм).

Захворювання, викликані грибами роду *Alternaria*, дуже поширені в усьому світі. Важливими рослинами-господарями є зернові і зернобобові культури. Першою ознакою альтернаріозу є темно-бурі або чорні плями різного розміру та форми, що виявляються на уражених частинах рослин. На листках альтернаріоз

має вигляд бурих плям полігональної форми, що обмежуються жилками та чітко контрастують із зеленим кольором здорового листка. Це є першою ознакою захворювання. На стеблах хвороба проявляється у вигляді поздовжніх смужок. У суху і теплу погоду захворювання протікає повільно з невеликою кількістю плям. При підвищеній вологості альтернаріоз швидко поширюється, уражаючи наземні органи рослин. Через коливання умов навколишнього середовища збудник не має рівномірної швидкості росту, тому плями розвиваються у вигляді цільової структури концентричних кілець. Темні, заглиблені ураження, як правило, є проявом альтернаріозу на коренях, стеблах. Спороутворення відбувається в цих язвах, формуючи тонкий, чорний, бархатистий ріст гриба та спор, що покривають уражену ділянку. Рослини відстають у рості.

Альтернаріоз на посівах пшениці виявляється в період цвітіння рослин і молочної спілості зерна у виді темних плям на колоскових лусочках. Пізніше, під час дозрівання зерна, спостерігається почорніння зародка («чорний зародок»).

Для фітопатогенного організму *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45 спостерігалась схожа тенденція прояву середнього рівня антагоністичної активності метаболітів штамів *B. subtilis*, але показники інгібування тест-культури мікроміцету надосадовою рідиною штамів *B. subtilis* Н10, *B. subtilis* Н36 і *B. subtilis* Н38 значно зменшились (<10 мм) у варіантах 120 годинного накопичення метаболітів.

Отримані дані свідчать, що штам *B. subtilis* Н40 знову відрізнявся від інших дослідних культур та проявляв середню активність (зона пригнічення росту тест-мікроміцету 16-17 та 12-14 мм відповідно).

В ході проведення досліджень виявлено, що біологічні активні речовини, які синтезуються штамми *B. subtilis* під час культивування та проникають у поживне середовище, інгібували ріст тест-мікроорганізму *Bipolaris sorokiniana* (антагоністична активність у вигляді зон пригнічення росту, табл. 5.3). Враховуючи те, що активними продуцентами сполук антифунгальної природи вважаються штами зі значенням індексу пригнічення не менше 25,0%, в процесі



досліджень прослідковано рівень активності для тих сполук, які виділялися бацилами на третю добу (72 год.) культивування бактерій.

Таблиця 5.3 – Вплив метаболітів штамів *B. subtilis* на ріст фітопатогенного мікроміцету *Bipolaris sorokiniana*

Надосадова рідина штаму	Зона затримки росту <i>Bipolaris sorokiniana</i> (мм) в залежності від накопичення метаболітів при періодичному культивуванні штаму (год.)	
	72 години	120 годин
<i>B. subtilis</i> H10	26-28	24-25
<i>B. subtilis</i> H36	27-29	24-26
<i>B. subtilis</i> H38	23-26	22-24
<i>B. subtilis</i> H40	28-30	27-29
<i>B. subtilis</i> IMB B-7516	27-30	26-29

Відомо, що природні мікроміцети *Gaeumannomyces*, які спричиняють офіобольозну кореневу гниль пшениці та знижують її урожайність, можуть характеризуватися різним рівнем патогенності на рослинах [230].

Проведені дослідження антагоністичної активності штамів *B. subtilis* з індикаторними тестовими фітопатогенами *Gaeumannomyces* та *Pythium* показали, що їх активність була більш виражена у варіантах з *B. subtilis* H40 та *B. subtilis* H36. Дещо змінюється характер антагоністичної активності у варіантах з *B. subtilis* H38 і *B. subtilis* H10 – у бік її зниження. Отримані результати щодо ефективності застосування надосадової рідини спорових бактерій штамів *B. subtilis* проти фітопатогенних мікроміцетів наведено у рис. 5.1.

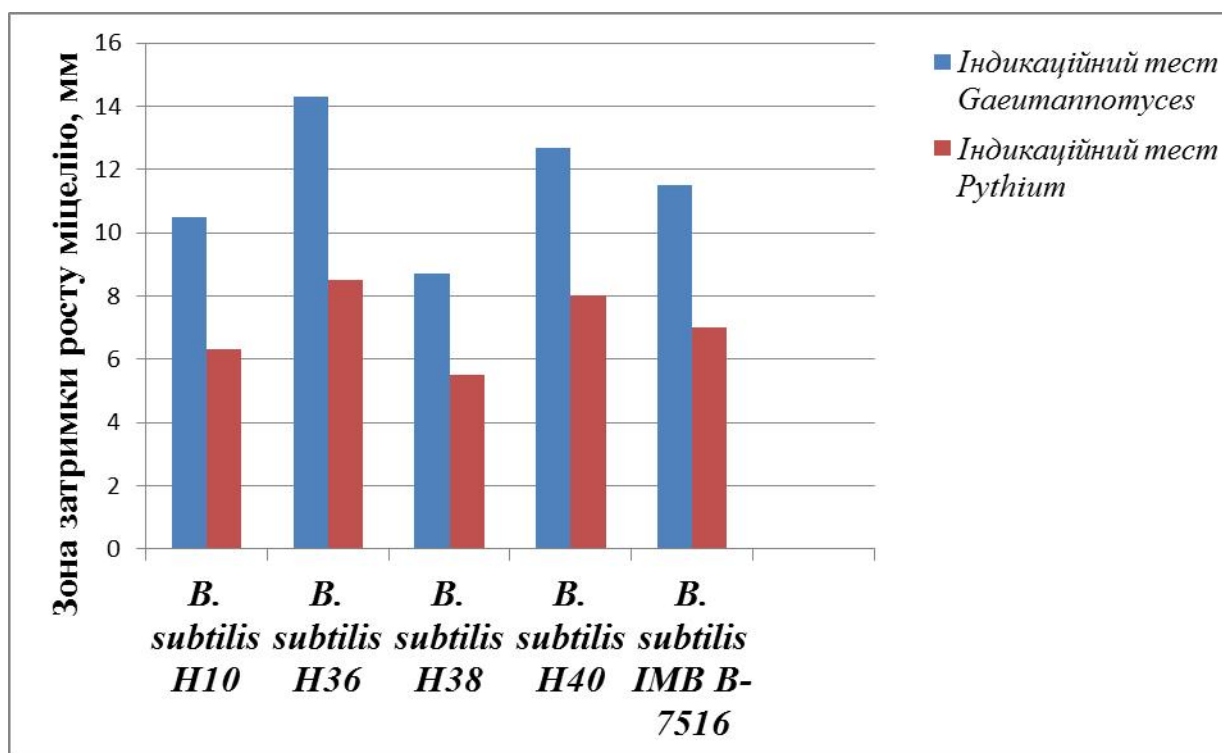


Рисунок 5.1 – Антагоністична активність штамів *B. subtilis* (надосадова рідина) проти фітопатогенних тестових мікроміцетів *Gaeumannomyces*, *Pythium*

*B. subtilis*, як бактеріальний ендофіт, займає ті ж екологічні ніші в рослинах, що й фітопатогенні форми мікроорганізмів. Тому він є перспективним біоконтрольним агентом для ефективної стратегії контролю збудників хвороб різних сільськогосподарських, культурних рослин.

Таким чином, результати проведених досліджень поповнюють існуючі відомості про антагоністичні властивості бактерій *B. subtilis*, які мають перспективу для біотехнології отримання ефективної антифунгальної продукції. В проведених дослідженнях штами *B. subtilis* H38, H40 виявляються активним як відносно фітопатогенних мікроміцетів, так і щодо фітопатогенних бактерій. Це дає можливість розглядати цей продуцент як основу для створення мікробного препарату нового покоління для фітоконтролю хвороб різної етіології.

## 5.2 Конкуレントоздатність ризосферних штамів бактерій *Bacillus subtilis*

### 5.2.1. Здатність до утворення біоплівки бактерій *Bacillus subtilis* на корінцях пшениці

З літературних джерел відомо про корисні для сільського господарства властивості ґрунтових мікроорганізмів в аспекті їх спроможності до біоплівкоутворення на поверхні рослин, адже біоплівка, яка складається з мікробіому, є важливим функціональним показником щодо захисту рослин від фітопатогенів [1, 167, 226, 227]. Такий фітозахист може бути обумовлений продукуванням спектру біологічно активних речовин та блокуванням сайтів адгезії на коренях рослин. Крім цього, штами ґрунтових мікроорганізмів, які здатні продукувати антимікробні метаболіти, можуть ефективно формувати біоплівку на коренях і, таким чином, інтегруватися у природні біоплівки та значно підсилювати їх захисні властивості.

Основним структурним компонентом біоплівок є матрикс, представлений мікробними екзополісахаридами, білками і гліколіпідами. Клітини у плівці упорядковані у вигляді різних утворень і так званих «стовпів», «цементованих» екзополісахаридами. Матрикс розділений каналами, заповненими водою та має порожнини. По каналах транспортуються поживні речовини та кисень, видаляються продукти життєдіяльності бактерій. У глибоких шарах розташовуються клітини, метаболізм яких переключений на анаеробний тип дихання. Вже зрілі плівки постійно виділяють у оточуюче середовище планктонні клітини і цілі фрагменти, здатні вкривати біоплівкою нові поверхні.

Взаємодії окремих субпопуляцій мікроорганізмів у складі біоплівки регулюються механізмом міжклітинних комунікацій (*quorumsensing*). Він функціонує через продукцію бактеріальними клітинами сигнальних молекул, які забезпечують колективну координацію експресії і репресії генів в мікробній популяції, забезпечуючи регуляцію складу бактеріальної популяції.

На сьогодні досліджено різні стадії формування біоплівки, які включають

початкове прикріплення до поверхні, формування моношару вздовж поверхні з утворенням мікроколонії, дозрівання біоплівки (*extracellular polymeric substance, EPS-matrix*) з утворенням тривимірної структури та дисперсія клітин [231, 232]. Щодо архітектури та організації різних біоплівок, от вони залежать від біоплівкоутворювальних бактеріальних видів. Існують дані, що одні й ті ж бактеріальні види можуть утворювати різні структури біоплівки в різних умовах навколишнього середовища (або змінюватись залежно від поживних умов та природи метаболічних взаємодій).

Дослідження явища формування біоплівки проводили у стаціонарній системі експрес-методом з використанням 96-луночного планшету. Аналіз особливостей формування біоплівки спороутворюючими штамами *B. subtilis* Н10, Н36, Н38 і Н40 показав, що досліджувані біоагенти виявляють здатність взаємодії з коренями тест-рослин пшениці.

Виявлено, що штам *B. subtilis* Н38 за час інкубації від 24 до 48 годин здатний формувати повноцінну біоплівку (табл. 5.4).

Таблиця 5.4 – Оцінка сформованості біоплівки штамів *B. subtilis*, тест-рослина – пшениця (*Triticum vulgare*).

Штам	Час інкубації, години	Біоплівка на коренях пшениці
<i>B. subtilis</i> Н10	24	++
	48	+++
<i>B. subtilis</i> Н36	24	+++
	48	+++
<i>B. subtilis</i> Н38	24	+++++
	48	+++++
<i>B. subtilis</i> Н40	24	+++
	48	+++

Штам *B. subtilis* Н10 проявив нижчу здатність до біологічного

плівкоутворення (рівень сформованості на 48 годину досліджень оцінено як початковий). Рівень утворення біоплівки штамми *B. subtilis* H36 та *B. subtilis* H40 не відрізнявся як на 24 годину, так і на 48 годину інкубації, що свідчить про їх агрономічно корисні властивості з боку компетенції рослинно-мікробної взаємодії та формування біоконтролюючих функцій щодо різних фітопатогенних організмів.

Клітини біоплівки можуть утворювати угруповання і брати участь у міжклітинній сигнальній діяльності з подальшою експресією генів, наприклад для продукування позаклітинних ферментів, які дозволяють бактеріям біоплівки використовувати складні джерела поживних речовин.

Бацили відомі своєю біоконтролюючою активністю і здатністю до продукування бациломіцинових, фенгіцинових та сурфактинових ліпопептидів. Бациломіцини та фенгіцини мають антагоністичну активність щодо грибних та бактеріальних збудників хвороб. За даними дослідників, *B. subtilis* продукують поверхнево-активні речовини, що викликають утворення біоплівки у філоплані рослин, що забезпечує тривалу стійкість та адекватну секрецію супресивних ліпопептидів, бациломіцинів та фенгіцинів, які ефективно контролюють патогени [233]. Отже, біоплівки розглядаються як профіль активної конкуренції в середовищі. За останнє десятиліття вчені отримали та поглибили знання про молекулярні механізми, які беруть участь у ініціації та припиненні утворення біоплівки.

### **Приживаність нових штамів *Bacillus subtilis* в ризосфері пшениці озимої**

Для виявлення антимікробної активності в ризосферному ґрунті (або безпосередньо в ґрунті) при штучному збагаченні відповідного субстрату-середовища культурами мікроорганізмів з антагоністичними властивостями важливо дослідити їх здатність приживатися в ґрунті, при цьому виявляти та аналізувати прояв активної конкуренції з різними представниками ґрунтового біому у ризосфері рослин. Отже, підтримуючи достатньо високу щільність популяції, можна успішно та екологічно безпечно контролювати фітопатогени протягом всього періоду вегетації. На сьогодні ще недостатньо вивчені закономірності колонізації різними штамми рослин пшениці, головної

продовольчої культури нашої країни. У цьому зв'язку актуальні дослідження рослинно-мікробних взаємодій, особливо щодо здатності інтродукованих штамів бактерій колонізувати екологічні ніші (наприклад, неоднорідну зональну фітосферу як цілу рослину, яка має різні зони: ризосферу (найбільшу чисельну та продуктивну), ендосферу /гітосферу/, яка переважно представлена асоціативними мікроорганізмами, та філосферу, яка надзвичайно екстремальна для мікроорганізмів.

За використання отриманих антибіотикорезистентних мутантів штаму *B. subtilis* Н38 (стійких до стрептоміцину, канаміцину), у модельному вегетаційному досліді було вивчено здатність *B. subtilis* Н38 приживатися в ґрунті ризосфери пшениці озимої. Максимальна концентрація антибіотиків для *B. subtilis* Н38 становила 1100 мкг./мл (ST), 120 мкг./мл (КА).

Проведені дослідження показали, що чисельність ST-резистентного мутанту штаму *B. subtilis* Н38 вже на 12 добу досліді становила 4,8 млн. КУО/г сухого ґрунту, а у контролі 3,9 млн. КУО (рис. 5.2).

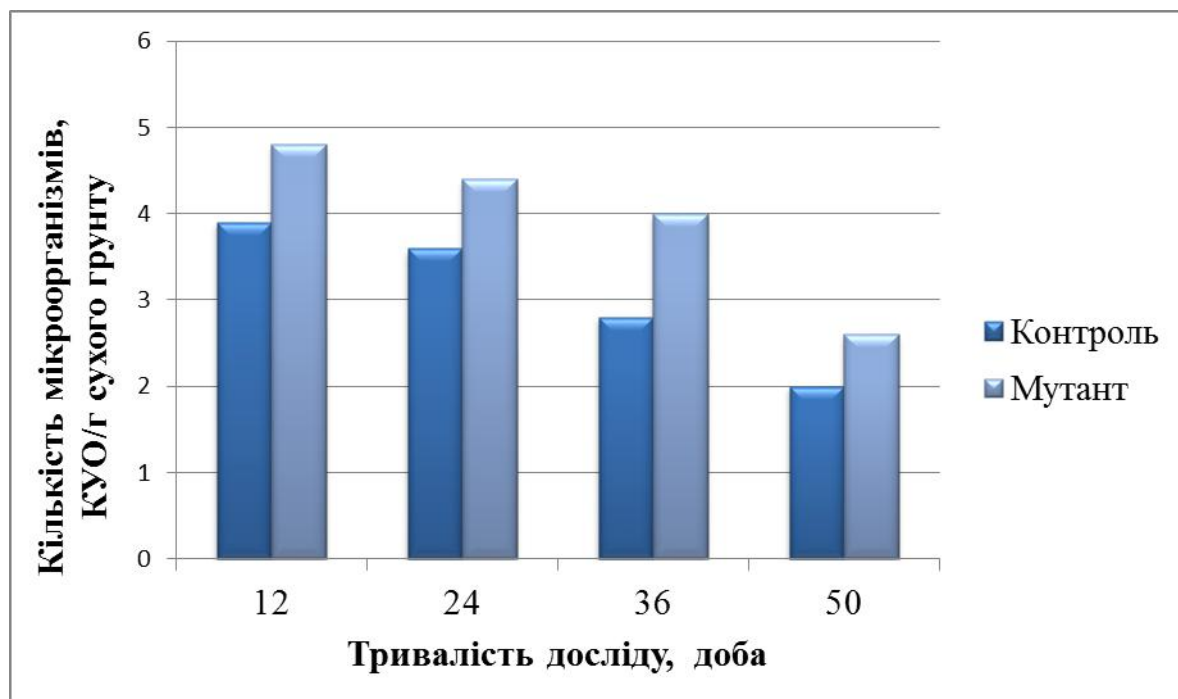


Рисунок 5.2 – Динаміка чисельності антибіотикорезистентного мутанту штаму *B. subtilis* Н38 (стійкого до стрептоміцину) у ризосфері пшениці озимої

На 24 та 36 добу досліді чисельність ST-резистентного мутанту штаму *B.*

*subtilis* Н38 поступово знижувалась (з 4,4 до 4,0 млн. КУО/г сухого ґрунту). Вже на 50 добу чисельність ST-резистентного мутанту штаму *B. subtilis* Н38 зафіксована до 2,6 млн. КУО/г сухого ґрунту, що на 30,0% перевищувало контрольний варіант. Якщо порівнювати дані з початком досліджень, то на 50 добу чисельність ST-резистентного мутанту штаму *B. subtilis* Н38 знижувалась у 1,8 разів.

Було досліджено та вивчено динаміку чисельності канаміцинрезистентного мутанту штаму *B. subtilis* Н38 у ризосфері пшениці озимої протягом 50 діб. Отримані дані свідчать про те, що на 12 добу дослідження кількість мутанту дослідженого штаму (КА-резистентного) становить 5,9 млн. КУО/г сухого ґрунту. Така тенденція може бути пов'язана з більш виразною антибактеріальною дією канаміцина, який має вплив на популяцію мікроорганізмів в ризосферному ґрунті.

Впродовж 36 діб динаміка чисельності КА-резистентного мутанту штаму *B. subtilis* Н38 знижувалась до 4,7 млн. КУО/г сухого ґрунту (зниження в середньому спостерігалось на 1,4% порівняно із контрольним варіантом). На 50 добу дослідження чисельність стійких до канаміцину бактерій штаму *B. subtilis* Н38 становила 3,5 млн. КУО/г сухого ґрунту ризосфери пшениці озимої (за 2,5 млн. КУО у контролі – природно стійкі бактерії), рис. 5.3.

Таким чином, протягом всього періоду проведення модельного дослідження зафіксовано поступове зниження резистентних мутантів штаму *B. subtilis* Н38 (ST-, та КА-резистентних) в діапазоні від 4,8-5,9 млн. КУО/г сухого ґрунту після 12 діб дослідження; до 2,6-3,5 млн. КУО/г сухого ґрунту наприкінці дослідження до 50 діб, що перевищувало контроль на 14,0-30,0% залежно від впливу відповідних антибіотиків.

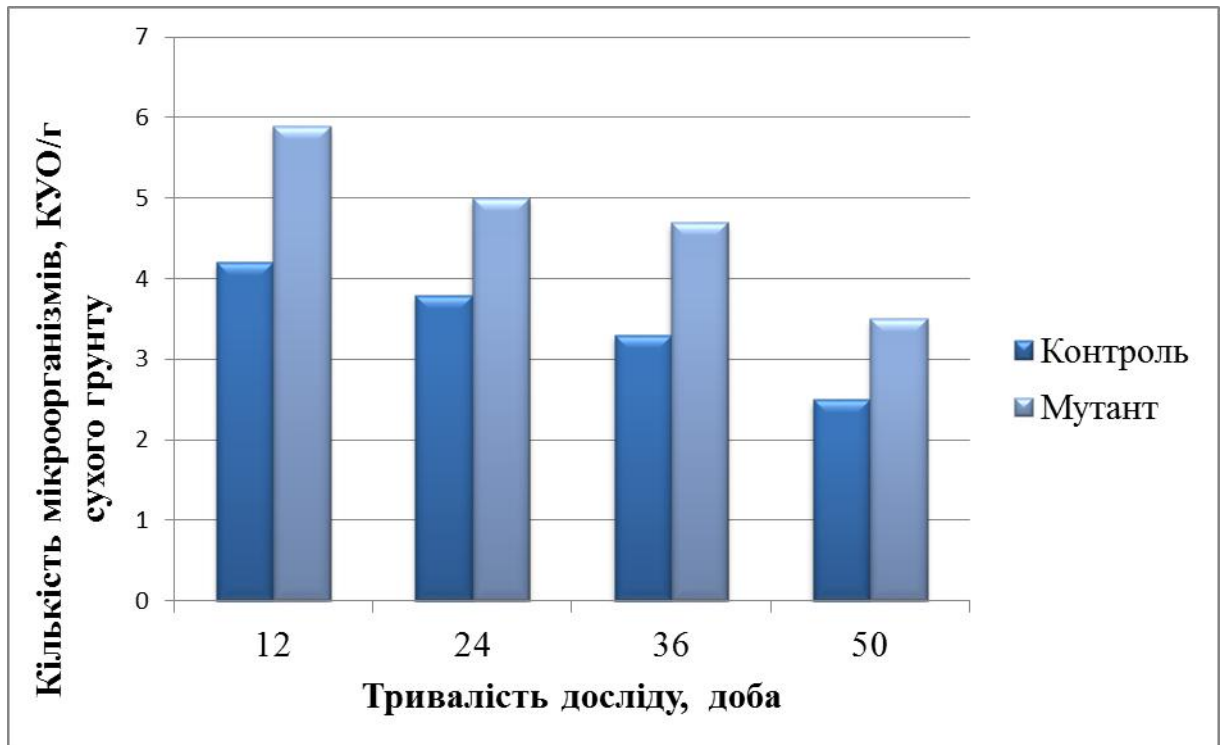


Рисунок 5.3 – Динаміка чисельності антибіотикорезистентного мутанту штаму *B. subtilis* H38 (стійкого до канаміцину) у ризосфері пшениці озимої

Результати досліджень підтверджують можливість розвитку бактерій *B. subtilis* в ризосфері пшениці озимої. Встановлено, що ступінь приживаності штаму *B. subtilis* H38 залежить від конкретно обраного для дослідження антибіотика (стрептоміцину і канаміцину). Максимальний ефект приживаності та активізації чисельності бактерій у ризосфері пшениці у порівнянні з контролем зафіксовано за впливом канаміцину, менша приживаність та кількість мікроорганізмів – у варіанті з стрептоміцинрезистентним мутантом штаму *B. subtilis* H38. Значна різниця з природно стійкими бактеріями (контролем) за динамікою чисельності мікроорганізмів спостерігалась у стрептоміцинрезистентного мутанту.

Проведені дослідження показали, що штам *B. subtilis* H38, який внесено в ґрунт з насінням озимої пшениці, ефективно приживався в ризосфері культури. Отримані дані свідчать, що характер колонізації рослини штамом мікроорганізму може мати залежність від його біологічних особливостей (структурних і



функціональних). Присутність біоагенту *B. subtilis*, зокрема його вміст в ризосферному ґрунті, спостерігали більше 45 діб (практично до повного завершення досліду, 50 діб), при цьому чисельність клітин становила не менше  $2,0 \times 10^6$  КУО/г ґрунту.

### Висновки до розділу 5

Спираючись на специфічність ефектів досліджених штамів *B. subtilis* на процеси міжмікробної взаємодії (спектр їх антагоністичної та антифунгальної активності, здатність до утворення біоплівки на корінцях рослин пшениці), а також динаміку приживаності та чисельності антибіотикорезистентних мутантів штаму *B. subtilis* Н38 у порівнянні з природно стійким штамом бактерій в ризосфері культури, можна підсумувати, що одним з провідних чинників існування корисних і функціонально значущих бацилярних представників мікробіому ризосферного ґрунту може бути рослинно-мікробна взаємодія на рівні метаболічних процесів.

За спектром антагоністичної активності нові штами *B. subtilis* Н38, Н40 характеризувались високою активністю щодо фітопатогенних бактерій *Pectobacterium carotovorum* 8982, *Xanthomonas campestris* 8003б, а також *Pseudomonas syringae* ssp., зокрема *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 і *P. syringae* pv. *syringae* 8511. Штами *B. subtilis* Н10, *B. subtilis* Н36 продемонстрували середню активність щодо вищезазначених тестових фітопатогенів.

Оцінка впливу метаболітів штамів *B. subtilis* (їх надосадової рідини) на ріст тест-культур фітопатогенних мікроміцетів *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2 та *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45 показала різний рівень антагоністичної активності. Так, для екологічно пластичного *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2 встановлено середній рівень антагоністичної активності надосадові рідини штамів *B. subtilis* (зона пригнічення росту мікроміцету складала в межах 16-18 мм за умов 72-годинного культивування бактерій). Штам *B. subtilis* Н40 відрізнявся від інших

дослідних штамів бацил, відповідно зона пригнічення росту тест-мікроміцету *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2 зафіксовано до 24-25 мм, що свідчить про високу активність біоагента). Встановлено, що при 120 годинах періодичного культивування дослідних штамів *B. subtilis* (*B. subtilis* H10, *B. subtilis* H36, *B. subtilis* H38, *B. subtilis* H40, *B. subtilis* IMB B-7516) антагоністична активність їх надосадової рідини поступово зменшувалась (пригнічення росту тест-мікроміцету не менше 12 мм).

Показана середню антагоністична активність метаболітів штаму *B. subtilis* H40 щодо тесту *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45, зона пригнічення росту даного мікроміцету складала 16-17, 12-14 мм в залежності від погодинного накопичення метаболітів у досліді. Виявлено, що біологічні активні речовини, які синтезуються штамми *B. subtilis* під час культивування та накопичуються у поживному середовищі та залишаються у фільтраті культуральної рідини, здатні активно інгібувати ріст тест-мікроміцету *Bipolaris sorokiniana*. Максимальна зона затримки росту даного фітопатогену склала 28-30 мм вже на 72 годину зрілості культури *B. subtilis* H40 у формі надосадової рідини. Показана антагоністична активність штамів *B. subtilis* H40 та *B. subtilis* H36. з індикаторними тестами *Gaeumannomyces* і *Pythium* (максимальна зона інгібування склала 12,7 мм і 8,0 мм; 14,3 мм і 8,5 мм для кожного мікроміцету відповідно). Досліджені антагоністичні властивості бактерій *B. subtilis* мають перспективу для агробіотехнології в аспекті отримання ефективної антифунгальної продукції.

Виявлено, що штам *B. subtilis* H38 за час інкубації від 24 до 48 годин здатний формувати повноцінну біоплівку, яка функціонально контролює та захищає рослини від фітопатогенів. Показано, що штам *B. subtilis* H38, який внесено в ґрунт з насінням озимої пшениці, ефективно приживався в ризосфері культури, при цьому ступінь приживаності штаму *B. subtilis* H38 залежить від вибраного антибіотика, зокрема стрептоміцину, канаміцину. Встановлено, що на 50 добу модельного досліді чисельність ST-резистентного мутанту штаму *B. subtilis* H38 становила 2,6 млн. КУО/г сухого ґрунту, що на 30,0% перевищує контроль. Щодо динаміки чисельності стійких до канаміцину бактерій штаму *B.*

*subtilis* НЗ8 спостерігалось збільшення приживаності бактерій, їх кількість становила 3,5 млн. КУО/г сухого ґрунту ризосфери пшениці озимої (за 2,5 млн. КУО у контролі, в якому досліджували природно стійкі бактерії *B. subtilis*).

**РОЗДІЛ 6****ЕКОНОМІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ НОВИХ ШТАМІВ  
*BACILLUS SUBTILIS* У ТЕХНОЛОГІЯХ ВИРОЩУВАННЯ ПШЕНИЦІ  
ОЗИМОЇ В АГРОЦЕНОЗАХ ЛІСОСТЕПУ УКРАЇНИ**

В умовах збройної агресії РФ на території України, економічної та енергетичної кризи, зниження природної родючості ґрунтів, забруднення їх високотоксичними сполуками, важкими металами, наслідків екоциду відбувається зниження продуктивності сільськогосподарських культур і погіршення якості продукції рослинництва в цілому. У зв'язку з цим надзвичайно гостро стоїть питання ведення екологічного землеробства, суть якого полягає у використанні потенційних можливостей агроecosистем та мінімального застосування препаратів хімічного синтезу при вирощуванні різних культур.

Таким чином, ефективність аграрного виробництва залежить від біологічного землеробства, яке має бути орієнтоване на раціональне використання земельних ресурсів, запобігання деградації, збереження та підвищення родючості ґрунтів та раціональне використання земель у часі, використання життєвих факторів сільськогосподарських рослин, зважаючи на їхні біологічні потреби [237].

Сьогодні у більшості ґрунтів аграрного використання окремі мікроорганізми або їх популяції, які завжди вважались індикаторами родючості, значно збідненні або не культивуються мікробіологічними методами. Сучасне сільськогосподарське виробництво повинне переорієнтуватись на використання вискоєфективних та маловитратних агротехнологій.

Розрахунки економічній ефективності застосування мікробних препаратів як засобів біологізації виробництва з фітозахисною та рістстимулювальною дією щодо пшениці озимої свідчать про те, що вони забезпечують підвищення рівня рентабельності виробництва зерна [235, 236].

В основу розрахунків економічних результатів від застосування мікробних агентів покладено показники урожайності культури, яка вирощується в конкретних природньо-кліматичних умовах, як основний показник, який

підтверджує ефективність застосування запропонованого засобу (препарату на основі штаму-продуценту або його аналогу, композиції штамів, хімічного варіанту тощо).

За науково-методичною основою розрахунків прийнято підходи, які ґрунтуються на традиційних методиках порівняння результатів від певного агрозаходу з витратами на його проведення за такими основними показниками економічної ефективності, як собівартість одиниці продукції, прибуток із розрахунку на одиницю продукції та на 1 га посівної площі та рентабельність виробництва [234, 238].

Для того щоб знизити собівартість продукції і підвищити рентабельність вирощування пшениці озимої слід підвищити її врожайність. Економічне обґрунтування доцільності використання біологічних препаратів при вирощуванні сільськогосподарських культур, зокрема зернових, є актуальним завданням, а особливо в умовах подорожчання традиційних ресурсів.

Урожайність сортів пшениці озимої на чорноземі типовому представлена у таблиці 6.1.

За даними польової апробації ефективності застосування нового штаму *B. subtilis* H40 при вирощуванні пшениці озимої в агроценозі Лісостепу України (2020-2023 рр.) встановлено, що даний біоагент та хімічний протруйник Фундазол сприяли приросту врожаю, табл. 6.2. Найбільш результативні дані отримано у варіанті досліду з інокуляцією бактеріями *B. subtilis* (штам H40).

Таблиця 6.1 – Урожайність пшениці озимої (сортів вітчизняної селекції) на чорноземі типовому (польовий дослід, 2019-2021 рр.)

Сорт	Урожайність, т/га	Оригігатор	Стійкість до вилягання, бал
1	2	3	4
Муза Білоцерківська	8,0	Білоцерківська дослідно-селекційна станція Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України	8

продовження табл. 6.1

1	2	3	4
Намисто	7,0	ННЦ «Інститут землеробства НААН України»	9
Щедрівка Київська	7,1	ННЦ «Інститут землеробства НААН України»	8-9
Гарантія Одеська	6,6	Селекційно-генетичний інститут НААН України	9
Трудівниця Миронівська	8,0	Миронівський інститут пшениці ім. В.М. Ремесла НААН України	9
Міп Дніпрянка	7,4	Миронівський інститут пшениці ім. В.М. Ремесла НААН України	8-9
Міп Валенсія	7,3	Миронівський інститут пшениці ім. В.М. Ремесла НААН України	8
Прозорий	6,4	Селекційно-генетичний інститут НААН України	8-9
Поліська 90	7,4	ННЦ «Інститут землеробства НААН України»	8
Традиція Одеська	6,8	Селекційно-генетичний інститут НААН України	8-9
Манера Одеська	6,5	Селекційно-генетичний інститут НААН України	9
Легенда Білоцерківська	8,14	Білоцерківська дослідно- селекційна станція	9
Шляхетний	7,1	Селекційно-генетичний інститут НААН України	9
Лісова пісня	8,2	Білоцерківська дослідно- селекційна станція	8-9
Прозорий	6,4	Селекційно-генетичний інститут НААН України	8-9
Лайнер	6,7	Селекційно-генетичний інститут НААН України	9
Нива Одеська	5,9	Селекційно-генетичний інститут НААН України	9
Ветеран	6,3	Селекційно-генетичний інститут НААН України	8-9

Таблиця 6.2 – Урожайність пшениці озимої (сорт Поліська 90) на чорноземі типовому (польовий дослід, 2020-2023 рр.)

Варіант дослідів	Урожайність, т/га	Приріст урожаю	
		т/га	%
Контроль (без обробки насіння хімічними та біологічними препаратами)	3,88	–	–
Інокуляція <i>B. subtilis</i> H40, $\geq 10^6$ кл./насінину	4,64	0,76	19,6
Протруєння Фундазолом, 50% з.п., 2 кг/га	4,31	0,43	11,1
НІР <sub>05</sub>	1,4		

За період, який охоплюють роки досліджень, ціни на зерно пшениці озимої мали тенденцію до зростання. Як наслідок, спостерігалися певні економічні ризики, а також суттєва залежність урожайності пшеничного агроценозу від погодно-кліматичних умов в період вегетації культури, які також варіюють за роками. Хоча, як відомо, пшениця озима може адаптуватися до умов вирощування, а за своїми біологічними особливостями здатна ефективно використовувати вологу, яка накопичується протягом зимового й весняного періоду.

Крім цього, урожайність пшениці в інтенсивних технологіях має значну залежність від вартості добрив, а вартість останніх прямо залежить від цін на енергоносії, зокрема природного газу, які протягом періоду, значно варіювали. Варто зазначити, що виробництво органічної продукції подібної залежності не має.

З огляду на стійку тенденцію до зростання цін на пшеницю, яка існувала в мирний час до агресії РФ, та вищі ціни на органічні технології, можна спрогнозувати й подальше зростання попиту на зерно.

При аналізі економічних показників вирощування пшениці озимої необхідно враховувати те, що фактично ціна 1 т зерна пшениці 3 класу значно зросла, наприклад з 2975 (2015 р.) до 6854 грн/т (2020 р.), тобто майже ніж у 2,5 рази, а ціни на зерно пшениці 5 класу зросли удвічі – з 2932 до 6091 грн/т [239].

Дані розрахунку економічної ефективності бактеризації пшениці озимої новим штамом *B. subtilis* H40 наведено у таблиці 6.3.

Як свідчать отримані показники, при проведенні передпосівної інокуляції насіння пшениці озимої урожайність зросла до 4,64 т/га порівняно із 3,88 т/га в контролі (без обробки насіння хімічними та біологічними препаратами), тобто на 0,76 т/га (19,6%).

Таким чином, при незмінній ціні зріс також дохід в розрахунку на 1 га на 19,6% (при збільшенні виробничих витрат на 163,0 грн./га (або на 1,0%).

Оскільки підвищення урожайності переважало збільшення витрат на проведення даного агрозаходу, то собівартість продукції зменшилась на 680,3 грн./ц (або на 18,4%).

Внаслідок комплексної дії зазначених факторів розмір прибутку на 1 га зріс більше ніж у два рази, а рентабельність виробництва підвищилась від 17,3% у контролі, до 39,0% – у дослідному варіанті з інокуляцією *B. subtilis* H40.



Таблиця 6.3 – Економічна ефективність застосування для бактеризації насіння пшениці озимої сорту Поліська 90 штаму *B. subtilis* H40 при вирощуванні культури в зоні Лісостепу України (середнє за 2020-2023 рр.)

Показники	Контроль	Інокуляція <i>B. subtilis</i> H40		
		значення	відхилення, +/-	
			абсолютне	відносне, %
Урожайність, т/га	3,88	4,64	+0,76	+19,6
Ціна реалізації, грн./1 т	5140,6	5140,6	–	–
Розрахункові витрати на 1 га, повна собівартість, грн.	16997	17160	+163	+1,0
у т.ч. додаткові виробничі витрати, грн./га	–	163		
Собівартість 1 т, грн.	4380,6	3700,3	-680,3	-18,4
Виручка від реалізації в розрахунку на 1 га, грн.	19945,5	23852,4	+3906,9	+19,6
Прибуток на 1 га, грн.	2948,5	6692,4	+3743,9	+127,0
Прибуток на 1 т, грн.	760,0	1440,3	+680,3	+89,5
Розрахунковий рівень рентабельності, %	17,3	39,0	+21,7	–

Кількісний вплив зміни урожайності пшениці озимої в результаті інокуляції та додаткових витрат на показники собівартості зерна визначили за формулою детермінованого факторного аналізу, табл. 6.4.

Таблиця 6.4 – Обчислення впливу зміни урожайності та витрат на відхилення собівартості зерна пшениці озимої за передпосівної інокуляції насіння штамом *B. subtilis* H40

Витрати на 1 га, грн.		Урожайність, ц/га		Собівартість 1 ц, грн.			відхилення, (+/-), грн.		
контроль	інокуляція	контроль	інокуляція	контроль	інокуляція	при витратах дослідного варіанту та урожайності контрольного	всього	у т.ч. за рахунок зміни	
								витрати на 1 га	урожайність
1	2	3	4	5=1:3	6=2:4	7=2:3	8=6-5	9=7-5	10=6-7
16997	17160	3,88	4,64	4380,6	3700,3	4422,7	-680,3	+41,0	-722,4

Аналіз зазначених показників свідчить, що внаслідок зміни рівня витрат у розрахунку на 1 га із 16997 до 17160 грн. собівартість 1 т зерна зросла на 41,0 грн. Однак за рахунок підвищення урожайності від 3,88 до 4,64 т/га вона зменшилась на 722,4 грн. В цілому було отримано зменшення собівартості 1 т зерна пшениці озимої у розмірі 680,3 грн.

За подальшими розрахунками встановлено наступне: загальне відхилення прибутку, відхилення прибутку за рахунок зміни урожайності та відхилення прибутку за рахунок зміни витрат.

Беручи до уваги розрахункову формулу щодо визначення кількісного впливу зміни досліджуваних факторів на відхилення прибутку (в розрахунку на 1 га):  $\Pi = (Y \times C) - B$  (див. розділ 2), використовували індексні позначення та обчислювали відповідні відхилення. Так, для отриманих показників у контролі – застосовано індекс «К» ( $\Pi_K, Y_K, B_K$ ), а для варіанту з інокуляцією *B. subtilis* – індекс «і» ( $\Pi_i, Y_i, B_i$ ).

Таким чином, загальне відхилення прибутку складає:

$$\Delta\Pi_{\text{заг.}} = \Pi_i - \Pi_k = 6692,4 - 2948,5 = +3743,9 \text{ грн./га.}$$

Відхилення прибутку за рахунок зміни урожайності складає:

$$\Delta\Pi_y = ((Y_i \times \Pi) - B_k) - \Pi_k = ((4,64 \times 5140,6) - 16997) - 2948,5 = 3906,9 \text{ грн./га.}$$

Відхилення прибутку за рахунок зміни витрат складає:

$$\Delta\Pi_b = \Pi_i - ((Y_i \times \Pi) - B_k) = 6692,4 - 6855,4 = -163,0 \text{ грн./га.}$$

Встановлено, що за рахунок підвищення урожайності, прибуток на 1 га зріс на 3906,9 грн. Такий економічний ефект від інокуляції цілком компенсував невелике зменшення прибутку за рахунок збільшення витрат на проведення бактеризації (-163,0 грн.).

При визначенні кількісного впливу зміни досліджуваних факторів на відхилення рентабельності виробництва зерна пшениці озимої встановлено, що загальне відхилення рентабельності становить 21,7% ( $\Delta P_{\text{заг}} = P_i - P_k = 39,0 - 17,3 = 21,7$ ).

Відхилення рентабельності за рахунок зміни урожайності склало 23,0% ( $\Delta P_y = (Y_i \times \Pi / B_k - 1) \times 100\% - P_k = (4,64 \times 5140,6 / 16997 - 1) \times 100\% - 17,3 = 23,0$ ).

Щодо відхилення рентабельності за рахунок зміни витрат, то розрахунок показав, що воно склало :

$$\Delta P_b = P_i - (Y_i \times \Pi / B_k - 1) \times 100\% = 39,0 - 40,2 = -1,2.$$

В результаті за рахунок підвищення урожайності пшениці озимої рівень рентабельності зріс на 23,0%. Такий суттєвий економічний ефект від інокуляції насіння цілком компенсував незначне зменшення рентабельності внаслідок збільшення витрат на проведення даного агрозаходу (-1,2%).

## Висновки до розділу 6

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать про високу економічну ефективність застосування заходів інокуляції новим штамом *B. subtilis* Н40 при вирощуванні пшениці озимої. Передпосівна інокуляція значно економить ресурси (при додаткових витратах в розрахунку на 1 га лише 1,0%).

Застосування штаму *Bacillus subtilis* Н40 як інокулянту є економічно доцільним та обґрунтованим, а також сприяє раціональному використанню енергоресурсів у сільськогосподарському виробництві, знижує собівартість продукції та підвищує її рентабельність на 21,7%.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено результати експериментальних досліджень біологічних властивостей штамів *Bacillus subtilis*. Теоретично обґрунтовано та практично вирішено наукове завдання, яке полягає у визначенні особливостей активізації специфічних продуцентів метаболітів нових штамів *B. subtilis*, адаптованих до умов ризосфери пшениці озимої.

1. При вивченні чисельності та складу ґрунтових мікроорганізмів у ризосфері 20 сортів пшениці озимої вітчизняної селекції у процесі онтогенезу виявлено варіабельність мікробної біомаси по сортовим варіантам та зміна мікробіому на користь екологопластичних бацил. Максимальне збільшення чисельності спороутворюючих бактерій виявлено при вирощуванні сортів Трудівниця Миронівська, Манера Одеська, Лайнер, Легенда Білоцерківська та Поліська 90 (в середньому  $4,2 \times 10^7$  КУО/г), що у два рази перевищує середні показники чисельності за іншими сортами, зокрема Міп Валенсія, Міп Дніпрянка ( $2,0 \times 10^7$  КУО/г ґрунту).

2. Встановлено значну диференціацію чисельності мікроорганізмів основних фізіологічних груп залежно від сорту пшениці озимої: розвиток вільно існуючих форм мікроорганізмів роду *Azotobacter*, а також мікроміцетних форм. Чисельність мікроміцетів за сортовими варіантами варіювала від 38,27 до 53,45 тис. КУО/г ґрунту. Чисельність олігонітрофільних бактерій в орному шарі ґрунту в посівах пшениці озимої упродовж вегетації зростала до 169-302 млн КУО/г ґрунту, що свідчить про проходження азотфіксувальних процесів. За показником біомаси бактерій під різними сортами пшениці озимої показано стабільне зростання із 6 до 9 т/га. Чисельність бактерій на різних поживних середовищах (МПА, ГА) мала змінний характер в діапазоні від 5,8 до  $231 \times 10^6$  КУО/г сухого ґрунту. За вирощування різних сортів пшениці озимої спостерігаються стабільні показники інтенсивності виділення  $\text{CO}_2$  – від 5,2 до 7,0, а також процесу поглинання  $\text{O}_2$  (не більше 5,3-6,8), що свідчить про створення оптимальних умов у ґрунті для життєдіяльності мікроорганізмів та потенційного підвищення його біологічної активності. За резуль

татами аналізу чисельності мікроорганізмів ризосфери пшениці озимої встановлено, що сортова специфічність має значний вплив на формування мікробіому в різні фази росту й розвитку рослин, що є інтегральним показником функціональної та метаболічної активності ґрунтових мікроорганізмів.

3. В результаті пошукових досліджень з агроценозу пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) – філоплана та ризосфера кореневої системи; профіль чорнозему типового до 40 см – виділено 29 ізолятів бактерій. З ризосфери пшениці озимої у фазу трубкування – відібрано 17 ізолятів бактерій, а у фазу колосіння-наливу зерна – 12. Показано, що найчастіше виявляється морфолого-колоніальне різноманіття спорових та мікроміцетних форм мікроорганізмів, що пояснюється достатніми умовами вологозабезпечення рослин пшениці в період вегетації (від початку весняної вегетації), а також сортовими особливостями конкретної польової ділянки.

4. За результатами первинного скринінгу з ризосфери пшениці озимої відібрано 19 ізолятів бактерій, які віднесено до колоніально-морфологічного різноманіття R-типу з діаметром від 7 мм до 13 мм, паличкоподібними клітинами розміром  $0,9-1,4 \times 2,5-3,6$  мкм та технологічною специфічністю за параметрами інтенсивності формування спор за рівних умов і термінів інкубації (до 48-72 годин). Виявлено до 90,0% вільних спор в аксенічних культурах вже через 72 години культивування та не більше 10,0% проспор у дослідних моноізолятів зі стабільними морфологічними ознаками. Доведено здатність ізолятів рости при широких діапазонах рН середовища від 4,5 до 8,0, що вказує на їх високі адаптивні властивості та життєздатність. Встановлено, що ізоляти Н10 і Н45 мають властивості рости при підвищених температурах культивування (+37...+40°C).

5. При диференційній фізіолого-біохімічній діагностиці встановлено, що як єдине джерело вуглецю дослідні ґрунтові ізоляти використовують з утворенням кислоти арабінозу, ксилозу, маніт, глюкозу, галактозу, фруктозу, мальтозу, сорбіт, гліцерин, декстрин, крохмаль, рамнозу і дульцит (з утворенням луку). Спостерігається активне використання мінеральних форм азоту: солі амонію і

нітрати, амінокислоти і білки. Ізоляти мають каталазну активність, оксидазопозитивні. За результатами біохімічного аналізу за допомогою тест-системи АРІ встановлено, що досліджувані ізоляти бактерій відрізняються за спектром зброджуваних вуглеводів, редукцією нітратів. За умов глибинної ферментації ізоляти Н38 і Н40 проявили здатність росту при підвищених температурних діапазонах культивування (40°C) протягом 48 годин (за фактом початку спороутворення). Різноманітність морфологічних та біохімічних особливостей спороутворюючих бактерій обумовлює відмінності в спектрі їх дії і прояві біологічних властивостей в середовищі. За ключовими морфологічними, фізіологічними і біохімічними ознаками штами природного типу Н3, Н10, Н13, Н36, Н38, Н40, Н43, Н45 споріднені з референтним штамом *B. subtilis* 8a та віднесено до роду *Bacillus* sp., виду *B. subtilis*.

6. Визначено особливості впливу нових штамів *B. subtilis* на розвиток тест-рослин (проростків пшениці озимої *Triticum aestivum* L.) у разі застосування інокуляційних бактеріальних культур. Доведено, що при розведеннях 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 спостерігається стимулювальна дія штамів *B. subtilis* Н3, Н10, Н13, Н36 (від мінімальної стимуляції за розведення культуральної рідини 1:500 до максимальної – за розведення 1:100).

7. Показано, що біологічна ефективність штамів *B. subtilis* значною мірою зумовлена продукуванням екзометаболітів, які зосереджуються у культуральній рідині. При цьому нативна культуральна рідина штамів *B. subtilis* Н10, Н13, Н40, Н43 і Н45 пригнічує ростові процеси, що свідчить про активізацію продуцентів ауксиноподібних сполук у культуральній рідині. При аналізі ефективності рослинно-мікробної взаємодії у разі інокуляції різними технологічними культурами *B. subtilis* показано доцільність застосування зрілих спорових культур *B. subtilis* ( $2,0 \times 10^7$  клітин на насінину), що дає можливість прояву рістстимулювальних властивостей нових штамів, зокрема за показниками сирої маси проростків і коренів *Triticum aestivum* L. Енергія проростання насіння *Triticum aestivum* L. підвищується при взаємодії з інокулянтами *B. subtilis* до 96,5%, а також збільшується сира маса проростків на 84,0-109,6% залежно від

варіанту досліду порівняно з контролем, що свідчить про рістстимулювальні властивості нових штамів. Доведено, що за використання зрілих спорових культур *B. subtilis* Н38, Н40 і Н45 відбувається зростання маси коренів на 4,8-11,3% порівняно з контролем без бактеризації. При обробці культуральними рідинами штамів *B. subtilis* Н3, Н10, Н13, Н36, Н43 у формі вегетативних клітин маса коренів зменшується на 11,8-44,0% порівняно з контролем. Розширено знання щодо особливостей впливу нових штамів *B. subtilis* на розвиток пшениці озимої як перспективних інокулянтів з ефектом рістстимуляції.

8. Встановлено стабільну технологічну активність штамів *B. subtilis* Н38, Н40, Н45 як при глибинному культивуванні в рідкому середовищі LB до 72 годин (титр спор від 1,89 до 2,43 млрд. спор/мл КР), так і при подальшому зберіганні культуральної рідини упродовж 60 діб в температурному діапазоні 18-20°C (титр спор стабільний в межах 1,81-2,33 млрд. спор/мл відповідно).

9. Оцінка впливу бактеріальних інокулянтів *B. subtilis* Н38, Н40, Н45 на фотосинтетичний апарат тест-рослин пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) в модельних умовах дозволила виявити високу інформативність індукційних змін флуоресценції хлорофілу (ІФХ) у структурній організації хлоропластів проростків пшениці за комплексом параметрів (на початковому, максимальному, стаціонарному рівнях флуоресценції та індексу життєздатності). У варіантах з бактеризацією технологічними штамами *B. subtilis* зі різних розведень встановлено ефективність фотосинтезу в оптимальних межах (індекс життєздатності  $R_{fd}$  відповідає нормальним показникам квантової ефективності фотосинтезу ( $\geq 1,50$ -2,50)).

10. Встановлено, що за спектром антагоністичної активності нові штами *B. subtilis* Н38, Н40 виявилися високоактивними відносно фітопатогенних бактерій: *Pectobacterium carotovorum* 8982 (зона затримки росту 23-21 мм), *Xanthomonas campestris* 80036 (зона затримки росту 37-30 мм), *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 (зона затримки росту 22-21 мм), *P. syringae* pv. *syringae* 8511 (зона затримки росту 26-24 мм). Штами *B. subtilis* Н10, *B. subtilis* Н36 проявили середню активність (зони затримки росту не перевищили 20,0 мм).



11. Встановлено, що біологічні активні речовини, які синтезуються штамми *B. subtilis* під час культивування та накопичуються у поживному середовищі, інгібують широкий спектр фітопатогенних мікроміцетів. Штам *B. subtilis* H40 продемонстрував високу антагоністичну активність щодо *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2 (зона пригнічення росту мікроміцету в межах 24-25 мм) та середню по відношенню до *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45 – 12-14 мм. Пролонгована міжмікробна взаємодія надосадових рідин *B. subtilis* H10, *B. subtilis* H36, *B. subtilis* H38, *B. subtilis* H40 та *B. subtilis* IMB B-7516, отриманих після 120 годинного культивування, зафіксована до рівня зони інгібування *Fusarium* не менше 12 мм на 10 добу експерименту. Зона затримки росту *Bipolaris sorokiniana* на третю добу продукування екзометаболітів штамми *B. subtilis* H10, *B. subtilis* H36 і *B. subtilis* H38 при періодичному культивуванні спостерігалась в межах 23-29 мм. Антагоністична активність надосадової рідини штамів *B. subtilis* H40 та *B. subtilis* H36 щодо індикаційних мікроміцетних тестів *Gaeumannomyces* та *Pythium* показала максимальні зони пригнічення 13,0 мм, 8,0 мм; 14,0 мм, 8,5 мм для кожного мікроміцету відповідно. Виявлені антагоністичні властивості штамів *B. subtilis* мають перспективу для агробіотехнології в аспекті отримання ефективної антифунгальної продукції.

12. Встановлено особливості формування біоплівки штамми *B. subtilis* H10, H36, H38 і H40 при взаємодії з кореневою системою рослин пшениці (як важливий функціональний показник щодо рослинно-мікробної біоконтролюючої компетенції щодо фітопатогенних організмів та профіль активної конкуренції в середовищі). За час інкубації від 24 до 48 годин штамми *B. subtilis* проявили здатність до біологічного плівкоутворення – від початкового рівня (*B. subtilis* H10) до повноцінного формування біоплівки (*B. subtilis* H38).

13. Показано, що штам *B. subtilis* H38, який внесено в ґрунт з насінням озимої пшениці, ефективно приживався в ризосфері культури, при цьому ступінь приживаності штаму залежить від вибраного антибіотика (стрептоміцину, канаміцину). Встановлено, що на 50 добу модельного дослідження чисельність ST-

резистентного мутанту штаму *B. subtilis* Н38 становила 2,6 млн. КУО/г сухого ґрунту, що на 30,0% перевищує контроль. Щодо динаміки чисельності стійких до канаміцину бактерій штаму *B. subtilis* Н38 спостерігалось збільшення приживаності бактерій, їх кількість становила 3,5 млн. КУО/г сухого ґрунту ризосфери пшениці озимої (за 2,5 млн. КУО у контролі, в якому досліджували природно стійкі бактерії *B. subtilis*). Отримані дані свідчать, що характер колонізації рослини штамом мікроорганізму може мати залежність від його біологічних особливостей (структурних і функціональних).

14. Доведено високу економічну ефективність застосування заходів інокуляції новим штамом *B. subtilis* Н40 при вирощуванні пшениці озимої. Передпосівна інокуляція значно економить ресурси (при додаткових витратах в розрахунку на 1 га лише 1,0%). Застосування штаму *Bacillus subtilis* Н40 як інокулянту є економічно доцільним та обґрунтованим, а також сприяє раціональному використанню енергоресурсів у сільськогосподарському виробництві, знижує собівартість продукції та підвищує її рентабельність на 21,7%.

## РЕКОМЕНДАЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Для сучасного аграрного виробництва продукції рослинництва рекомендується застосування мікробних препаратів на основі нових штамів *B. subtilis*, адаптованих до умов ризосфери пшениці озимої, як перспективних інокулянтів з ефектом рістстимуляції та біоконтролю фітопатогенних організмів:

- доцільно використання інокулянтів *B. subtilis*, які наносяться на насіння, у зрілих технологічних формах (спорових культурах) із розрахунку  $2,0 \times 10^7$  клітин на насініну. Результатом взаємодії виявляється стимуляція росту і розвитку пшениці озимої та стабілізація її продукційного процесу;
- для біотехнології отримання ефективної антифунгальної продукції пропонуються перспективні штами *B. subtilis* Н38, Н40 з антагоністичними властивостями проти спектру фітопатогенних мікроміцетів та бактерій (*Fusarium sporotrichioides*, *Alternaria alternata*, *Gaeumannomyces*, *Pythium*, а також *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* ssp.) як базова основа для створення мікробного препарату нового покоління для фітоконтролю хвороб різної етіології).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гадзало Я. М., Патыка Н. В., Заришняк А. С. Агробіологія ризосфери рослин: монографія. К. : Аграрна наука, 2015. 386 с.
2. Смирнов В. В., Сорокулова И. Б., Пинчук И. В. Бактерии рода *Bacillus* – перспективный источник биологически активных веществ. *Мікробіологічний журнал*. 2001. 63(1). С. 72–78.
3. Bechet M., Caradec T., Hussein W. M., et al. Structure, biosynthesis and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. 95(3). P. 593–600.
4. Патыка В. П., Тихонович І. А., Філіп'єв І. Д. та ін. Мікроорганізми та альтернативне землеробство: монографія. К. : Урожай, 1993. 274 с.
5. Azizbekyan R. R. Biological Preparations for the Protection of Agricultural Plants (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019. 55. P. 816–823.
6. Іутинська Г. О. Ґрунтова мікробіологія: навчальний посібник. К. : Арістей, 2006. 284 с.
7. Волкогон В. В., Надкернична О. В., Ковалевська Т. М., Токмакова Л. М. та ін. Мікробні препарати у землеробстві. Теорія і практика: монографія. К. : Аграрна наука, 2006. 312 с.
8. Петриченко В. Ф., Бомба М. Я., Патыка М. В., Періг Г. Т., Іващук П. В. Землеробство з основами екології, ґрунтознавства та агрохімії: навчальний посібник. К. : Аграрна наука, 2011. 492 с.
9. Андреюк К. І., Іутинська Г. О., Антипчук А. Ф., Валагурова О. В., Козирицька В. Є., Пономаренко С. П. Функціонування мікробних ценозів ґрунту в умовах антропогенного навантаження. К. : Обереги, 2001. 240 с.
10. Патыка М. В., Колодяжний О. Ю. Формування мікробного комплексу чорнозему типового в агроценозі пшениці озимої за різних систем землеробства. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2014. № 2. С. 26 – 33.
11. Шерстобоева О. В. Оптимізація структури мікробних угруповань кореневої зони озимої пшениці: автореф. ... на здобуття наук. ступеня д-ра с.-г. наук:

03.00.16. Київ, 2004. 43 с.

12. Alonso C., Ramos-Cruz D., Becker C. The role of plant epigenetics in biotic interactions. *New Phytol.* 2019. 221. P. 731–737.

13. Berg G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2009. 84. P. 11–18.

14. Olanrewaju O. S., Glick B. R., Babalola O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2017. 33(11). P. 197–204.

15. Sorokulova I. Preclinical testing in the development of probiotics: regulatory perspective with bacillus strains as an example. *Clin. Infect. Dis.* 2008. 46. P. 92–95.

16. Кандыбин Н. В., Патыка Т. И., Ермолова В. П., Патыка В. Ф. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis*. СПб. Пушкин: Инновационный центр защиты растений, 2009. 245 с.

17. Allison R. Mason, Lois S. Taylor, Jennifer M. DeBruyn. Microbial ecology of vertebrate decomposition in terrestrial ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology.* 2023. 99(2). February, fiad006.

18. Prescott L. M., Willey J. M., Sherwood L. M., Woolverton C. J. 5 edition. De Boeck Supérieur; Louvain-la-Neuve. 2018. Microbiologie. 5 edition.

19. Atlas R. M. 3rd ed. CRC Press; Boca Raton, FL. 2010. Handbook of microbiological media.

20. Пати́ка Т. І., Пати́ка М. В. Біотехнологія мікробного синтезу. Вінниця: ТОВ «Нілан ЛТД», 2018. 272 с.

21. Nakamura L. K., Roberts M. S., Cohan F. M. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. *nov.* and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. *nov.* *J. Syst. Bacteriol.* 1999. 49(3). P. 1211–5.

22. Marcelino L. A., Tawfeeq Al-Ani L. Kh., Castañeda-Ramirez G. S., et al. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Chapter 3. Microbial technologies to enhance crop production for future needs. Trends of

Microbial Biotechnology for Sustainable Agriculture and Biomedicine Systems: Diversity and Functional Perspectives. 2020. P. 29–47.

23. Смирнов В. В. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных. К., 1983. 49 с.

24. Звягинцев Д. А. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М., 1991. 304 с.

25. Murray P. R, Baron E. J., Pfaller M. A., et al. Manual of Clinical Microbiology. 7th edition, Washington D. C., ASM Press. 1999. 146 p.

26. Cartwright P. *Bacillus subtilis* – Identification and Safety. *Probiotics News*, 2009. 2. P. 1 – 3.

27. Jun S., Si F., Pugatch R., Scott M. Fundamental Principles in Bacterial Physiology - History, Recent progress, and the Future with Focus on Cell Size Control: A Review. *Rep. Prog. Phys.* 2018. May. 81(5). P. 056601.

28. Carlson C. R., Caugant D. A., Kolsto A. B. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. 60. P. 1719–1725.

29. Hashem A., Tabassum B., Fathi Abd Allah E. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi J Biol Sci.* 2019. Sep. 26(6). P. 1291 – 1297.

30. Merck Microbiology Manual. 12th edition. Merck. Darmstadt, Germany. 2005. 688 p.

31. Sara E. Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. Diomandé, Christophe Nguyen-The. *Front Microbiol.* 2015. 6. P. 813.

32. Скороход И. А., Рой А. А., Мелентьев А. И., Курдиш И. К. Влияние биологически активных веществ фосфатминерализующих штаммов рода *Bacillus* на семена растений, подвергнутые оксидативному стрессу. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2013. № 2. С. 41–51.

33. Сорокулова І. Б., Сафронова Л. А., Виноградов В. П., Тишкевич В. М., Хілько Т. В., Старенька С. Я., Лапа С. В. Корекція Біоспорином порушень

- мікробіоценозу кишечника у новонароджених дітей. *Современная педиатрия*. 2014. № 3. С. 121–124.
34. Сафронова Л. А. Биологическая активность пробиотических штаммов бацилл – основы препарата эндоспорина. *Доповіді НАН України*. 2015. № 6. С. 138–146.
35. Logan N. A., De Vos P. *Bacillus*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria Whitman, William Barnaby, ed. Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria. NJ: Wiley, 2015. P. 1-164.
36. Mandic-Mulec I., Stefanic P., van Elsas J. D. Ecology of *Bacillaceae*. *Microbiology Spectrum*. 2015. 3(1). P. 1–24.
37. Nicholson W. L. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2002. 59(3). P. 410–416.
38. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 2005. 56(4). P. 845–857.
39. Kaspar F., Neubauer P., Gimpel M. Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review. *J. Nat. Prod.* 2019. 82(7). P. 2038–2053.
40. Raina V., Nayak T., Ray L., Kumari K., Suar M. Chapter 9. A Polyphasic Taxonomic Approach for Designation and Description of Novel Microbial Species. *Microbial Diversity in the Genomic Era*. Academic Press, 2019. P. 137–152.
41. Бойко М. В., Пати́ка Т. І., Пати́ка М. В., Ві́нцковська Ю. Ю. Оці́нка антагоні́стичних властиво́стей шта́мів бакте́рій ро́ду *Bacillus*. *Садівництво*. 2017. № 72. С. 148–155.
42. Wunschel D., Fox K. F., Black G. E., Fox A. Discrimination among the *Bacillus cereus* group, in comparison to *B. subtilis*, by structural carbohydrate profiles and ribosomal RNAspacer region PCR. *Syst. Appl. Microbiol.* 1995. 17(4). P. 625–635.
43. Schloss P. D., Handelsman J. Biotechnological prospects from metagenomics *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003. 14. P. 303–310.
44. Nair A. J. Introduction to biotechnology and genetic engineering. Infinity Science Press LLC. Hingham; Massachusetts; New Delhi, 2008. 798 p.
45. Паты́ка Т. И., Паты́ка Н. В. Фи́логене́ticheские взаи́мосвязи се́рологи́ческих ва́риантов *Bacillus thuringiensis*. *Biopolymers and Cell*. 2009. 25(3). С. 240–244.

46. Гадзало Я. М., Патика М. В., Заришняк А. С., Патика Т. І. Агромікробіологія з основами біотехнології: монографія. К. : Аграрна наука НААН, 2019. 204 с.
47. Егоров Н. С. Промышленная микробиология. М. : Высш. шк., 1989. 680 с.
48. Кольман Я. Наглядная биохимия. М., 2000. 469 с.
49. Vitorino L. C., Bessa L. A. Technological Microbiology: Development and Applications. Sec. Food Microbiology. *Front. Microbiol.* 2017. P. 8.
50. Патика В. П., Коць С. Я., Волкогон В. В. та ін. Біологічний азот. К. : Світ, 2003. 424 с.
51. Costacurta A., Vanderleyden J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 1995. 21. P. 1–18.
52. Briški F., Vuković Domanovac M. Environmental microbiology. *Physical Sciences Reviews.* 2017. 2(11). P. 20160118.
53. Rivero R. M., Shulaev V., Blumwald E. Cytokinin-dependent photorespiration and the protection of photosynthesis during water deficit. *Plant Physiol.* 2009. 150(3). P. 1530–1540.
54. Полевой В. В. Фитогормоны. Л., 1982. 248 с.
55. Кулаева О. Н., Кузнецов В. В. Новейшие достижения и перспективы в области изучения цитокининов. *Физиология растений.* 2002. 49(4). С. 626–640.
56. Timmusk S., Nicander B., Granhall U., Tillberg E. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry.* 1999. 31. P. 1847–1852.
57. Ortíz-Castro R., Valencia-Cantero E., López-Bucio J. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signaling and Behavior.* 2008. 3. P. 263–265.
58. Karadeniz A., Topcuoglu S. F., Inan S. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production insome bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 2006. 22. P. 1061–1064.
59. Gutierrez-Manero F. J., Ramos-Solano B., et al. The plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *B. lichiniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum.* 2001. 111(2). P. 206–211.
60. Li W., Lee S. Y., Cho Y. J., et al. Mediation of induced systemic resistance by the



- plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* S2-3-2. *Mol Biol Rep.* 2020. 47. P. 8429–8438.
61. Шлегель Г. Общая микробиология. М. : Мир, 1987. 566 с.
62. Leveau J. H. J., Lindow S. E. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Applied and Environmental Microbiology.* 2005. 71. P. 2365–2371.
63. Saleem M., Arshad M., Hussain S., Bhatti A.S. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 2007. 34. P. 635–648.
64. Jacoby R., Peukert M., Succurro A., et al. The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition-Current Knowledge and Future Directions. *Frontiers in Plant Science.* 2017. № 8. P. 1–16.
65. Costerton J. W. Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 1995. № 15. P. 137–140.
66. Пати́ка В. П., Гуля́єва Г. Б., Богдан М. М., Токовенко І. П., Пасі́чник Л. А., Пати́ка М. В., та ін. Фітогормональний статус і фотосинтетична активність рослин м'якої пшениці за дії біологічно активних речовин. *Физиология растений и генетика.* 2019. 51(2). С. 133–146.
67. Пати́ка Т. І., Пати́ка М. В., Цизь О. М. Природний консорціум ґрунтових мікроорганізмів (Екстракон) для оздоровлення агроценозів. *Садівництво.* 2019. № 74. С. 144–153.
68. Khalid A., Arshad M., Zahir Z. A. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology.* 2004. 96(3). P. 473–480.
69. Гатауллин А. Г. Биологические свойства штаммов *Bacillus subtilis*, перспективных для создания новых пробиотиков: автореф. ... канд. биол. наук: 03.00.07. М., 2005.
70. Guillén-Navarro K., López-Gutiérrez T., García-Fajardo V., Gómez-Cornelio S., Zarza E., De la Rosa-García S., Chan-Bacab M. Broad-Spectrum Antifungal, Biosurfactants and Bioemulsifier Activity of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* – A

- Potential Biocontrol and Bioremediation Agent in Agriculture. *Plants*. 2023. 12. P. 1374.
71. Barros F. F. C., Simiqueli A. P. R., De Andrade C. J., Pastore G. M. Production of enzymes from agroindustrial wastes by biosurfactant-producing strains of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Res. Int.* 2013. ID 103960. 9 p.
72. Крючкова Л. О. Кореневі і прикореневі хвороби пшениці: монографія. К., 2016. 164 с.
73. Rahma H., Nurbailis Kristina N. Characterization and potential of plant growth-promoting rhizobacteria on rice seedling growth and the effect on *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biodiversitas*. 2019. 20. P. 3654 – 3661.
74. Bravo A., Gomez I., Porta H., et al. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *In: Microbial Biotechnol.*, 2013. 6. P. 17–20.
75. Casula G., Cutting S. M. *Bacillus* probiotics: Spore germination in the gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol.* 2002. 68. P. 2344–2352.
76. Сорокулова И. Б., Рыбалко С. Л., Руденко А. А., и др. Пробиотик субалин – принципиально новый подход к лечению бактериальных и вирусных инфекций. К., 2006. 36 с.
77. Hadjouti R., Oulebsir-Mohandkaci H., Farida B., Furze J. Enhancing agriculture recovery of *Phaseolus vulgaris* L. and *Cucurbita pepo* L. with *Olea europaea* L. plant growth promoting rhizobacteria. *Soil Research*. 2022. 60(8). P. 850 – 863.
78. Андреюк Е. И., Валагурова Е. В. Основы экологии почвенных микроорганизмов. К. : Наукова думка, 1992. 223 с.
79. Przemieniecki S. W., Kurowski T. P., Damszel M., Krawczyk K., Karwowska A. Effectiveness of the *Bacillus* sp. SP-A9 Strain as a Biological Control Agent for Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Agr. Sci. Tech.* 2018. 20. P. 609–619.
80. Bouizgarne B. Bacteria for plant growth promotion and disease management. Bacteria in agrobiolology. ed. Maheswari D. K., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2013. 870 p.
81. Al-Kobaisi M. F., Jawetz Melnick. Adelberg's Medical Microbiology. 24 th. edition. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2007.7(3). P. 273–5.

82. Биргер М. О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. М. : Медицина, 1982. 312 с.
83. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М. : Мир, 1978. 330 с.
84. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии. М. : Колос, 1993. 175 с.
85. Прилуцький Ю. І., Ільченко О. В., Цимбалюк О. В., Костерін С. О. Статистичні методи в біології: підручни. для студентів ВНЗ. К. : Наукова думка, 2017. 211 с.
86. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта с основами статистической обработки результатов исследований. М. : Агропромиздат, 1985. 351 с.
87. Ленгелер И., Дреус Г., Шлегель Г. Современная микробиология. Прокариоты: в 2 т. М. : Мир, 2005. Т.1. 2005. 656 с.; Т.2. 2005. 496 с.
88. Егоров Н. С. Выделение микробов антагонистов и биологические методы учета их антибиотической активности. М., 1957. 182 с.
89. Song J., et al. Antifungal activity of *Chaetomium elatum* against *Pyricularia oryzae* Causing Rice Blast. *International Journal of Agricultural Technology*. 2016. 1(7.1). P. 1437–1447.
90. Irkitova A. N., Grebenshchikova A. V., Yatsenko E. S., Speranskaya N. Y., Matsyura A. V. Morphological diversity of *Bacillus subtilis*. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2018. 8(2). P. 365–370.
91. Barreto H. C., Cordeiro T. N., Henriques A. O., et al. Rampant loss of social traits during domestication of a *Bacillus subtilis* natural isolate. *Sci. Rep.* 2020. 10. P. 18886.
92. Garrity G. M., Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2: The *Proteobacteria*, Part C: The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, and *Epsilonproteobacteria*. Springer. 2005. 1415 p.
93. Gerhardt Ph., Murray R. G. E., Wood W. A., Krieg N. R. Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1994. 791 p.

94. Kirk J. L., Beaudette L. A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J. N., Lee H., Trevors J. T. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*. 2004. 58(2). P. 169–188.
95. Safronova L. A., Zelena L. B., Klochko V. V., Reva O. N. Does the applicability of *Bacillus* strains in probiotics rely upon their . *Can. J. Microbiol.* 2012. 58(2). P. 212–219.
96. Reva O., Dixelius C., Meijer J., Priest F. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens*. *FEMS Microbiol. and Ecol.* 2004. № 48. P. 249–259.
97. Reva O. N., Sorokulova I. B., Smirnov V. V. Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001. 51(Pt 4). P. 1361–1371.
98. Радченко О. С. Фізіолого-біохімічні властивості мікроорганізмів та методи їх визначення: навчальний посібник. ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2012. 211 с.
99. Пати́ка В. П., Пасі́чник Л. А., Гвоздяк Р. І., Петри́ченко В. Ф., Корні́йчук О. В., та ін. Фітопатогенні бактерії. Методи досліджень. ТОВ Віндрук. 2017. 432 с.
100. Бельтюкова К. И., Королева И. Б., Мурас В. А. Бактериальные болезни зернобобовых культур. К. : Наук. думка, 1974. 338 с.
101. Davranov K., Shurigin V. V., Mammadiev A., Ruzimova K. Epiphytic bacteria *Bacillus subtilis* UzNU-18 from jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) – the active biocontrol agent of phytopathogenic microorganisms. *Мікробіологічний журнал*. 2019. 81(3). С. 27–39.
102. Авдєєва Л. В., Хархота М. А., Хархота Г. В. Деструкція пожнивних рослинних залишків штамами *Bacillus subtilis* IMB В-7516 і *B. licheniformis* IMB В-7515. *Мікробіологічний журнал*. 2016. 78(2). С. 52–60.
103. Kaneda T. Fatty acids on the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriological reviews*. 1977. № 2. P. 391–418.

104. Slabbinck B., De Baets B., Dawyndt P., De Vos P. Towards large-scale FAME-based bacterial species identification using machine learning techniques. *Systematic and Applied Microbiology*. 2009. 32. P. 163–176.
105. ДСТУ 4287:2004. Качество почвы. Отбор проб.
106. Люта В., Кононов О. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень та основами імунології. К. : Здоров'я. 2006. 510 с.
107. Волкогон В. В., Надкернична О. В., Токмакова Л. М. та ін. Експериментальна ґрунтова мікробіологія: монографія. К. : Аграрна наука, 2010. 463 с.
108. Аристовская Т. В. Микробиология подзолистых почв. М.-Л. : Наука, 1965. 187 с.
109. Аристовская Т. В. Теоретические аспекты проблемы численности, биомассы и продуктивности почвенных микроорганизмов. Вопросы численности, биомассы и продуктивности почвенных микроорганизмов. Л. : 1972. С. 7–20.
110. Красильников Н. А. Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов. М., 1966. 216 с.
111. Tresner H. D., Backus V. H., Curtis J. T. Soil microfungi in relation to the hardwood forest continuum in Sourher Wisconsin. *Mycologia*. 1954. 46(3). P. 314-333.
112. Хоулт Дж., Криг Н., Синг П. Определитель бактерий Берджи. 9-е изд. В 2-х т. М. : Мир, 1997.
113. Билай В. И. Фузарии. К. : Наукова думка, 1977. 443 с.
114. Валагурова Е. В., Козырицкая В. Е., Иутинская Г. А. Актиномицеты рода *Streptomyces* (описание видов и компьютерная программа их идентификации). К. : Наукова думка, 2003. 648 с.
115. Смирнов В. В., Киприанова Е. А. Бактерии рода *Pseudomonas*. К. : Наукова думка, 1990. 264 с.
116. Иутинская Г. А., Пономаренко С. П., Андреюк Е. И. и др. Биорегуляция микробно-растительных систем. К. : Ничлава, 2010. 464 с.

117. Коць С. Я., Моргун В. В., Патыка В. Ф., Петриченко В. Ф., Надкерничная Е. В., Кириченко Е. В. Биологическая фиксация азота: [монографія в 4-х т.]. Т. 4: Асоціативна азотфіксація. К. : Логос, 2014. 412 с.
118. Li Ting Wang, Fwu-Ling Lee, Chun-Ju Tai, Hiroaki Kasai. Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group . *Int. J. Syst. Evol. Microbiology*. 2007. 57. P. 1846–1850.
119. Cai D., Rao Y., Zhan Y., Wang Q., Chen S. Engineering *Bacillus* for efficient production of heterologous protein: current progress, challenge and prospect. *J. Appl. Microbiol.* 2019. 126. P. 1632–1642.
120. Мельникова Н. М., Михалків Л. М., Омельчук С. В., Береговенко С. К. Ризосферні мікроорганізми як фактор регулювання формування бобово-ризобіального симбіозу. *Физиология растений и генетика*. 2018. 50(4). С. 299–321.
121. Shabayev P. Response of legumes to co-inoculation with nodule bacteria and plant growth promoting rhizobacteria. *Int. J. Sci. Technol.* 2015. 5(9).
122. Holguin G., Bashan Y. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.). *Soil Biol. Biochem.* 1996. 28(12). P. 1651–1660.
123. Terpolilli J. J., O'Hara G. W., Tiwari R. P., Dilworth M. J., Howieson J. G. The model legume *Medicago truncatula* A17 is poorly matched for N<sub>2</sub> fixation with the sequenced microsymbiont *Sinorhizobium meliloti* 1021. *New Phytol.* 2008. 179(1). P. 62–66.
124. Glick B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*. 2012. 963401.
125. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М. : Мир, 2002. 317 с.
126. Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R., Ahmed I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol.*, 2010. 60. P. 579–598.
127. Gupta G., Parihar S. S., Ahirwar N. K., Snehi S. K., Singh V. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J. Microb. Biochem. Technol.*, 2015. 7. P. 96–102.

128. Jha Y. Potassium mobilizing bacteria: enhance potassium intake in paddy to regulates membrane permeability and accumulate carbohydrates under salinity stress. *Braz. J. Biol. Sci.*, 2017. 4(8). P. 333–344.
129. Etesami H., Emami S., Alikhani H. Potassium solubilizing bacteria (KSB): mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects — a review. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 2017. 17(4). P. 897–911.
130. Sumayo M. S., Son J. S., Ghim S. Y. Exogenous application of phenylacetic acid promotes root hair growth and induces the systemic resistance of tobacco against bacterial soft-rot pathogen *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Funct. Plant Biol.* 2018. 45(11). P. 1119–1127.
131. Rao G. S., Rao Reddy N. N., Surekha Ch. Induction of plant systemic resistance in legumes *Cajanus cajan*, *Vigna radiata*, *Vigna mungo* against plant pathogens *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata* – a *Trichoderma viride* mediated reprogramming of plant defense mechanism. *Int. J. Recent Sci. Res.*, 2015. 6(5). P. 4270–4280.
132. Ayangbenro A. S., Babalola O. O. A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, 2017. 14(1). P. E94.
133. Faust K., Raes J. Microbial interactions: from networks to models. *Nat Rev Microbiol.* 2012. 10. P. 538–550.
134. Kent A. D., Triplett E. W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annu Rev Microbiol.* 2002. 56. P. 211–236.
135. Katsy E.I. (ed.) Plasticity in Plant-Growth-Promoting and Phytopathogenic Bacteria. New York: Springer, 2014. 208 p.
136. Van Jaarsveld C. M., Smit M.A. Krüger G. H. J. Interaction amongst soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] genotype, soil type and inoculant strain with regard to N<sub>2</sub> fixation. *J. Agr. Crop Sci.* 2002. 188(3). P. 206–211.
137. Marinkovic J., Bjelic D., Tintor B., Miladinovic J. Dukic V., Dordevic V. Effects of soybean co-inoculation with plant growth promoting rhizobacteria in field trial. *Rom.Biotech. Lett.*, 2018. 23(2). P. 13401–13408.

138. Berestetskiy O. A., Vozniakovskaia Yu. M., Dorosinskiy L. M. Biologicheskie osnovy plodorodiia pochvy [Biological basis of soil fertility]. M. : Kolos, 1984. 287 p.
139. Polgári M., Gyollai I., Fintor K., Horváth H., Pál-Molnár E., Biondi J. C. Microbially Mediated Ore-Forming Processes and Cell Mineralization. *Front Microbiol.* 2019. 10. P. 2731.
140. Kim Y. S., Balaraju K., Jeon Y. H. Biological characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens* AK-0 and suppression of ginseng root rot caused by *Cylindrocarpon destructans*. *Journ Appl. Microbiol.* 2016. 122. P. 166–179.
141. Chowdhury S. P., Uhl J., Grosch R., Alqueres S., Pittroff S., Diete K., Schmitt-Kopplin P., Borriss R., Hartmann A. Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defense responses toward the bottom rot pathogen *Rhizoctonia solani*. *Mol Plant-Microbe Inter.* 2015. 28. P. 984–995.
142. Ding T., Su B., Chen X., Xie S., Gu S., Wang Q., et al. An endophytic bacterial strain isolated from *Eucommia ulmoides* inhibits southern corn leaf blight. *Front. Microbiol.* 2017. 8. P. 903.
143. Gond C. K., Bergen M. S., Torres M. S., White Jr J. F. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defense gene expression in maize. 2015. *Microbiol Res.* 172. P. 79–87.
144. Patyka N. V., Patyka T. I. Symbiotic microbial communities of insects: functioning and entomopathogenic action potential initiation on the example of *Bacillus thuringiensis*. *Mikrobiologichnyy Zhurnal.* 2020. 82(1). P. 62–73.
145. Kriuchkova L. O., Patyka T. I. Efficacy of *Bacillus* spp. strains against barley diseases caused by *Bipolaris sorokiniana* on cultivars of different resistance. *Biological Systems: Theory And Innovation.* 2020. 11(4). P. 66–75.
146. Safronova L. A., Zelena L. B., Klochko V. V., Reva O. N. Does the applicability of *Bacillus* strains in probiotics rely upon their taxonomy. *Can. J. Microbiol.* 2012. 58(2). P. 212–219.



147. Reva O. N., Dixelius Ch., Meijer J., Priest F. G. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens*. *FEMS Microbiol. and Ecol.* 2004. 48. P. 249–259.
148. Жукова Д. А., Ключко В. В., Зелена Л. Б., Рева О. М., Драговоз І. В., Авдєєва Л. В. Таксономічний аналіз штаму *Bacillus* sp. УКМ В-7404 – антагоніста фітопатогенних мікроміцетів. *Мікробіологічний журнал*. 2015. 77(2). С. 9–14.
149. Гродзинский А. М., Гродзинский Д. М. Краткий справочник по физиологии растений. К. : Наук. думка, 1973. 567 с.
150. Patyka M. V., Kolodyazhnyy O. Yu., Ibatullin I. I. Evaluation of metagenomas and detection of functionally significant polymorphisms of soil prokaryotes using the method of pyrosequencing. *Mikrobiologichnyy Zhurnal*. 2016. 78(2). P. 43–50.
151. Cerna B., Elhoiova D., Santruckova H. Functional groups of soil microbial community. *Structure and Function of Soil Microbiota*. 2003. P. 3–6.
152. Honchar A. N., Tonkha O. L., Patyka N. V., Makarchuk O. S. Peculiarities of change in number and composition of winter wheat rhizosphere microbiome in the process of ontogenesis. *Plant and soil science*. 2021. 12(3). P. 56–65.
153. Сергійчук М. Г. Будова бактеріальної клітини та методи її дослідження. К. : Фітоцентр, 2001. 323 с.
154. Chuiko N. V., Chobotarov A. Yu., Kurdish I. K. Growth and phytase activities of *Bacillus subtilis* IMV B-7023 during cultivation with sodium phytate. *Мікробіологічний журнал*. 2021. 83(6). P. 13–19.
155. Meijer W. J., Wisman G. B., Terpstra P., Thorsted P. B., Thomas C. M., Holsappel S., Venema G., Bron S. Rolling-circle plasmids from *Bacillus subtilis*: complete nucleotide sequences and analyses of genes of pTA1015, pTA1040, pTA1050 and pTA1060, and comparisons with related plasmids from gram-positive. *FEMS Microbiology Reviews*. 1998. 21(4). P. 337–368.
156. Poluektova E. U., et al. Plasmid transfer in *Bacilli* by a self-transmissible plasmid p19 from a *Bacillus subtilis* soil strain. *Plasmid*. 2004. 52(3). P. 212–217.

157. Harwood C. R., et al. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS Microbiol. Rev.* 2018. 42(6). P. 721–738.
158. Ding J., Zhang Y., Deng Y., Cong J., Lu H., Sun X., Yang C., Yuan T., Van Nostran J. D., Li D., Zhou J., Yang Y. Integrated metagenomics and network analysis of soil microbial community of the forest timberline. *Scientific Reports.* 2015. 5. P. 7994.
159. Carrera E., Peterson S. N. Isolation and Screening of Antibiotic-Producing *Bacillus* and *Pseudomonas* Species. *Faseb.* 2020. 34(1). P. 1.
160. Meyers A., Furtmann C., Jose J. Direct optical density determination of bacterial cultures in microplates for high-throughput screening applications. *Enzyme Microb. Technol.* 2018. 118. P. 1–5.
161. Berghaus L. J., Giguère S., Guldbech K. Comparison of Etest, disk diffusion, and broth macrodilution for in vitro susceptibility testing of *Rhodococcus equiequi*. *J. Clin. Microbiol.* 2015. 53. P. 314–318.
162. Valgas C., De Souza S. M., Smânia E. F. A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *J. Microbiol.* 2017. 38. P. 369–380.
163. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках: учеб. для студ. биол. спец. ун-тов. [4-е изд., испр. и доп.]. М. : Высш. шк., 1986. 448 с.
164. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. Current protocol in Mol. Biol. 2001. P. 2.4.1–2.4.5.
165. Edwards K., Logan J., Saunders N., et al. Real-time PCR: An essential guide. UK: Horizon Bioscience. 2004. 346 p.
166. O’Callaghan M. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. 100. P. 5729–5746.
167. Kurdysh I. K. Interaction of bacteria with solid materials and nanomaterials as the basis of new biotechnologies. *Mikrobiologichnyy Zhurnal.* 2018. 80(3). P. 15–28.
168. Mawarda P. C., Le Roux X., van Elsas J. D., Salles J. F. Deliberate introduction of invisible invaders: A critical appraisal of the impact of microbial inoculants on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry.* 2020. 148.

169. Kozar S. F. The strategy of regulating the activity of diazotrophs during their introduction into the agrocenoses of agricultural crops. *Agricultural microbiology*. 2021. 33. P. 33–43.
170. Borko Yu. P., Patyka M. V., Boiko M. V., Honchar A. M., Sinchenko V. M. The features of taxonomic structure formation of soil microbial biome in *Beta vulgaris* rhizosphere. *Mikrobiologichnyy Zhurnal*. 2022. 84(1). P. 3–16.
171. Faust K., Raes J. Microbial interactions : from networks to models. *Nat Rev Microbiol*. 2012. 10. P. 538–550.
172. Yadav A. K., Sirohi P., Saraswat S., Rani M., Singh M. P., Srivastava S., Singh N. K. Inhibitory Mechanism on Combination of Phytic Acid with Methanolic Seed Extract of *Syzygium cumini* and Sodium Chloride over *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol*. 2018. 75(7). P. 849–856.
173. Karadeniz A., Topcuoglu S. F., Inan S. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production insome bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2006. 22. P. 1061–1064.
174. Krutylo D. V., Nadkernychna O. V., Sherstoboyeva O. V., Ushakova M. A. Korektsiya ryzobial'nykh uhrupovan' gruntu za introduktsiyi *Bradyrhizobium japonicum* riznykh henetychnykh hrup. [Correction of rhizobial groups of the soil with the introduction of *Bradyrhizobium japonicum* of different genetic groups]. *Agroecological journal*. 2018. 2. P. 73–81.
175. Patyka V. P., Hulyayeva H. B., Bohdan M. M., et al. Phytohormonal status and photosynthetic activity of common wheat plants under the influence of biologically active substances. *Physiology of plants and genetics*. 2019. 51(2). P. 133–146.
176. Liu Y., Li J., Du G., Chen J., Liu L. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* fueled by systems biology: Recent advances and future directions. *Biotechnol. Adv*. 2017. 35. P. 20–30.
177. Yashchenko S. A., Hrabovs'ka T. O., Hrabovs'kyi M. B., Slobodenyuk O. I. Effectiveness of biological preparation Enteronormin at early stages of ontogenesis of winter wheat plants. *Agroecological journal*. 2019. 2. P. 50–54.

178. Berendsen R. L., Pieterse C. M. J., Bakker P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Science*. 2012. 17. P. 478–486.
179. Ferone M., Gowen A., Fanning S., Scannell A. G. M. Microbial detection and identification methods: bench top assays to omics approaches. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2020. 19(6). P. 3106–3129.
180. Boyko M. V., Patyka N. V., Patyka T. I. Estimation of productivity *Bacillus thuringiensis* on different med. *Microbiology & Biotechnology*. 2017. 1. P. 16–22.
181. Crickmore N. The diversity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins. In: Charles J. F., Delecluse A., Nielsen-Le Roux C., editors. *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. P. 65–79.
182. Reva O. N., Sorokulova I. B., Smirnov V. V. Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001. 51(4). P. 1361–1371.
183. Yamborko H. V., Yelyns'ka N. O., Zinchenko O. Yu., Vasylyeva N. Yu. Mikrobiolohiya z osnovamy virusolohiyi: metodychni vkazivky do laboratornykh zanyat' dlya studentiv khimichnoho fakul'tetu [Microbiology with the basics of virology: a methodical instructions to the laboratory classes for students of the faculty chemistry]. Odessa national university named after I. I. Mechnikov, Odesa, 2018. 52 p.
184. Lengeler J., Drews G., Schlegel H., editors. *Biology of prokaryotes*. Oxford: Blackwell Science, 1999. 328 p.
185. Blagodatskij S. A., et al. Rehydration method for determining the biomass of microorganisms in the soil. *Pochvovedenie*. 1987. 7. P. 64–71.
186. Harirchi S., Sar T., Ramezani M., Aliyu H., Etemadifar Z., Nojoumi S. A., Yazdian F., Awasthi M. K., Taherzadeh M. J. *Bacillales*: From Taxonomy to Biotechnological and Industrial Perspectives. *Microorganisms*. 2022. 10. P. 2355.
187. Kovács N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature (London)*. 1956. 17. P. 703.

188. Lui J. K., Jurtshuk P. Jr. N,N,N'-N'-tetramethyl-p-phenylenediamine-dependent cytochrome oxidase analyses of *Bacillus* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1986. 36(1). P. 38–46.
189. Shields P., Cathcart L. Oxidase test protocol. American Society for Microbiology, Laboratory Protocols, 2016. P. 1–9.
190. Goldman E., Green L. Practical Handbook of Microbiology. Third Edition. Boca Raton: CRC Press, 2015. 1055 p.
191. Amin F. A. Z., Sabri S., Ismail M., et al., Probiotic properties of *Bacillus* strains isolated from stingless bee (*Heterotrigona itama*) honey collected across Malaysia, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2020. 17(1). P. 278.
192. Debabov V. G. The industrial use of *Bacilli*, in *The Molecular Biology of the Bacilli*, USA, New York, 1981. P. 331–371.
193. Franco-Duarte R., et al. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms – from past to present. *Microorganisms*. 2019. 7(5). P. 130.
194. Gingichashvili S., Duanis-Assaf D., Shemesh M., et al., The adaptive morphology of *Bacillus subtilis* biofilms: a defense mechanism against bacterial starvation, *Microorganisms*. 2020. 8(61). P. 1–13.
195. Radchenko M. M., Tigunova O. O., Zelena L. B., Beiko N. Ye., Andriiash H. S., Shulga S. M. Phylogenetic Analysis of the *Bacillus subtilis* IFBG MK-2 Strain and Riboflavin Production by Its Induced Clones. *Cytol Genet*. 2021. 55(2). P. 145–151.
196. Федоренко В. О., Осташ Б. О., Гончар М. В., Ребець Ю. В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. Львів: видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2006. 279 с.
197. Мартиненко О. І. Методи молекулярної біотехнології: Лабораторний практикум. К. : Академперіодика, 2010. 231 с.
198. Колоян А. О., Овсебян А. С. Оптимизация условий ферментационной среды для биосинтеза L-аргинина штаммом – продуцентом *Brevibacterium flavum* НК-19А. *Биол. Журн. Армении*. 2009. 3(61). С. 38–44.
199. Griffith A. J. F., Miller J. H., Suzuki D. T., Lewontin R. C, Gelbart W. M An introduction to genetic analysis. 7th edition. N.Y:W.H. Freeman, 2008. 864 p.

200. Freidberg E. C. Walker G. C., Siede W. DNA repair and mutagenesis. Washington: ASM Press, 1995. 698 p.
201. Guttel R., Larsen N., Woese C. Lessons from an evolving rRNA:16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Review.* 1994. 8(1). P. 10-24.
202. Kirovants M., Patyka T., Patyka M. Phylogenetic analysis of dominant microorganisms of the genera *Bacillus* and *Phyllobacterium* isolated from the rhizosphere of spring barley. *Bulletin of Agrarian Science.* 2020. 98(5). P. 48–53.
203. Bakker H., Berendse, R., Doornbo, R., Winterman, P., Pieters, C. The rhizosphere revisited: Root microbiomics. *Front Plant Sci.* 2013. 4. P. 165–172.
204. Gutierrez-Manero F. J., Ramos-Solano B., et al. The plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *B. lichiniiformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum.* 2001. 111(2). P. 206–211.
205. Karadeniz A., Topcuoglu S.F., Inan S. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production insome bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 2006. 22. P. 1061–1064.
206. Gulyaeva G. B., Patyka V. P., Tokovenko I. P., Patyka, M. V., Maksin, V. I., Kaplunenko, V. G. Physiological effect of nanoaquacitrates of silver and copper on the development of *Galega orientalis* in the case of application of a consortium of microorganisms and artificial infection of *Acholeplasma laidlawii* var. *Granulum*. *Physiology of plants and genetics.* 2019. 50(1). P. 39–45.
207. Коць С. Я., Кірізій Д. А., Павлище А. В. Взаємодія процесів асиміляції азоту і вуглецю у рослин сої, оброблених речовинами із фунгіцидною активністю та бульбочковими бактеріями, інкубованими з лектином. *Доповіді Національної академії наук України.* 2018. 7. С. 88–95.
208. Коць С. Я. Біологічна фіксація азоту: досягнення та перспективи розвитку. *Фізіологія рослин і генетика.* 2021. 53(2). С. 128–159.
209. Portable fluorometer "Florotest": instructions for use. Kyiv: Institute of Cybernetics named after V.M. Hlushkova National Academy of Sciences of Ukraine, 2013. 24 p.

210. Romanov V. O., Artemenko D. M., Bryko Yu. O., et al. Family of portable devices "Floratest": preparation for mass production. *Computer facilities, networks and systems*. 2011. 10. P. 85–93.
211. Verma J. P., Jaiswal D. K., Krishna R., Prakash S., Yadav J., Singh V. Characterization and screening of thermophilic *Bacillus* strains for developing plant growth promoting consortium from hot spring of Leh and Ladakh region of India. *Front. Microbiol.* 2018. 9. P. 1293.
212. Vorobei Y., Lohosha O. Dynamics of formation and functioning of legume-rhizobial symbiosis Mesorhizobium ciceri-Cicer arietinum (variety Pam'iat'). *Australasian Journal of Agricultural Engineering*. January 2021. P. 129–136.
213. Santos A. F., Corrêa B. O., Klein J., Bono J. A. M., Pereira L. C., Guimarães V. F., Ferreira M. B. Biometria e estado nutricional da cultura da aveia branca (*Avena sativa* L.) sob inoculação com *Bacillus subtilis* e *B. megaterium*. *Research, Society and Development*. 2021. 10(5). e53410515270.
214. Guimarães V. F., Klein J., Silva A. S. L., Klein D. K. Eficiência de inoculante contendo *Bacillus megaterium* (B119) e *Bacillus subtilis* (B2084) para a cultura do milho, associado à fertilização fosfatada. *Research, Society and Development*. 2021. 10(4). e431101220920.
215. Poveda J., González-Andrés F. *Bacillus* as a source of phytohormones for use in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2021. 105. P. 8629–8645.
216. Tsotetsi T., Nephali L., Malebe M., Tugizimana F. *Bacillus* for Plant Growth Promotion and Stress Resilience: What Have We Learned? *Plants*. 2022. 11. P. 2482.
217. Saxena A. K., Kumar M., Chakdar H., Anuroopa N., Bagyaraj D. J. *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *J Appl Microbiol.* 2020 Jun. 128(6). P. 1583–1594.
218. Oleńska E., Małek W., Wójcik M., Swiecicka I., Thijs S., Vangronsveld J. Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. *Sci Total Environ.* 2020. 15(743). P. 140682.

219. Li H., Yue H., Li L., Liu Y., Zhang H., Wang J., Jiang X. Seed biostimulant *Bacillus* sp. MGW9 improves the salt tolerance of maize during seed germination. *AMB Express*. 2021. May 25. 11(1). P. 74.
220. Accinelli C., Abbas H. K., Shier W. T. A bioplastic-based seed coating improves seedling growth and reduces production of coated seed dust. *J. Crop Improv.* 2018. 32. P. 318–330.
221. Teixeira G. M., Mosela M., Abreu Nicoletto M. L., Ribeiro R. A., Hungria M., Youssef K., Yukio Higashi A., Mian S., Sampaio Ferreira A., Azeredo Gonçalves L. S., et al. Genomic insights into the antifungal activity and plant growth-promoting ability in *Bacillus velezensis* CMRP 4490. *Front. Microbiol.* 2021. 11. P. 618415.
222. Pandey R. P., Srivastava A. K., Gupta V. K., O'Donovan A., Ramteke P. W. Enhanced yield of diverse varieties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by different isolates of *Mesorhizobium ciceri*. *Environmental Sustainability*. 2018. 1(4). P. 425–435.
223. Lastochkina O., Garshin, D., Ivano, S., Yuldashe, R., Khafizov, R., Allagulova C., Fedorova K., Avalbaev A., Maslennikova D., Bosacchi M. Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* modulates physiological responses of two different *Triticum aestivum* L. cultivars under drought stress. *Plants*. 2020. 9. P. 1810.
224. Calvo P., Nelson L., Kloepper J. W. Agricultural Uses of Plant Biostimulants. *Plant Soil*. 2014. 383. P. 3–41.
225. Yadav A. K., Chandra K. Mass production and quality control of microbial inoculants. *Proc. Indian Nat. Sci. Acad.* 2014. 2. P. 483–489.
226. Галкін М. Б., Ліманська Н. В., Філіпова Т. О., Іваниця В. О. Формування біоплівки бактеріями *Lactobacillus plantarum* на коренях рослин *Lepidium sativum* L. *Мікробіологія і Біотехнологія*. 2012. 3. С. 34–43.
227. Galkin M. B., Ivanytsia V. O., Galkin B. M., Filipova T. O. [Biofilm matrix – chemical composition, structure, functions]. *Microbiology & Biotechnology*. 2016. 4. P. 6–27.
228. Patyka T. I., Patyka N. V. *Bacillus thuringiensis* spp. *israelensis* and Control of *Aedes aegypti* Invasive Mosquitoes Species in Ecosystems. *Mikrobiolohichnyy Zhurnal*. 2020. 82(5). P. 88–97.



229. Cheng Y. T., Zhang L., He S. Y. Plant-microbe interactions facing environmental challenge. *Cell Host Microbe*. 2019. 26. P. 183–192.
230. Kriuchkova L. O., Olifer D. R. Pathogenicity of *Gaeumannomyces tritici* (J. Walker) Hern.-Restr. & Crous, the take-all fungus and efficacy of *Bacillus* strains against disease. *Biological systems: theory and innovation*. 2020. 11(4). P. 76–86.
231. Franklin M. J., Chang C., Akiyama T., Bothner B. New Technologies for Studying Biofilms. In: Microbial biofilms / Ghannoum M., Parsek M., Whiteley M., Mukherjee P. K. [eds]. 2nd edition. Washington DS: Asm Press, 2015. P. 1–32.
232. Dufour D., Leung V., Lévesque C. M. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*. 2012. 22. P. 2–16.
233. Yadav M. K. Role of Biofilms in Environment Pollution and Control. *Microbial Biotechnology*. Vol. 1. Applications in Agroculture and Environment. Patra J. K., Vishnuprasad Ch. N., Das G. [eds]. Singapore: Springer Nature, 2017. P. 377–398.
234. Govorunov A. N., Len V. S., Ignatenko N. M. Opredeleniye ekonomicheskoy effektivnosti v zemledelii i zhivotnovodstve razrabotok po selskokhozyaistvennoy mikrobiologii: Metodicheskiye rekomendatsii [Economic efficiency determination in agriculture and livestock farming of agricultural microbiology developments: learner's guide]. Chernihiv, Ukr. NIISKhM UAAN Publ., 1991. 98 p.
235. Lori M., Symnaczik S., Mader P., De Deyn G., Gattinger A. Organic farming enhances soil microbial abundance and activity – a metaanalysis and meta-regression. *Plos one*. 2017. Vol. 12. №. 7. e0180442.
236. Волкогон В. В., Волкогон М. В., Дімова С. Б. Рістстимулювальні мікроорганізми. Експериментальна ґрунтова мікробіологія. Аграрна наука. 2010. С. 383–416.
237. Petrychenko V., Korniychuk O., Voronetska I. Biological farming in conditions of transformational changes in the agrarian production of Ukraine. *Agricultural Science and Practice*, 2018. 5(2). P. 3 – 12.
238. Cherenkov A. V., Rybka V. S. (Eds.). *Naukovo-praktychnyi dovidnyk po obgruntuvanniu poelementnykh normatyviv trudovykh, hroshovo-materialnykh ta enerhetychnykh vytrat na vyrobnytstvo zernovykh kultur*. Dnipropetrovsk 2014.

239. Маренич М. М., Дяжук Р. У. Економічна ефективність вирощування органічної пшениці в умовах недостатнього зволоження Степу України. *Вісник ПДАА*. 2022. № 2. С. 92–99.
240. Honchar A., Tonkha O., Patyka N., Lykholat Y., Patyka T. Morphological and physiological-biochemical variability of isolates of spore-forming bacteria selected from the agrocenosis of winter wheat. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2021. 12(4). P. 588-593.
241. Shrestha A, Kim B. S., Park D. H. Biological control of bacterial spot disease and plant growth-promoting effects of lactic acid bacteria on pepper. *Biocontrol Sci Techn* 2014. 24(7). P. 763-779.
241. Коць С. Я., Моргун В. В., Патыка В. Ф., Маличенко С. М., Маменко П. Н. и др. биологическая фиксация азота: бобово-ризобиальный симбиоз. В 4 т. К. : Логос, 2011. Т. 2. 523 с.
242. Коць С. Я., Воробей Н. А., Кириченко О. В., Мельникова Н. М., Михалков Л. М., Пухтаєвич П. П. Мікробіологічні препарати для сільського господарства. К. : Логос, 2016. 48 с.
243. Krutylo D. V., Nadkernychna O. V., Sherstoboyeva O. V., Ushakova M. A. Korektsiya ryzobial'nykh uhrupovan' gruntu za introduktsiyi *Bradyrhizobium japonicum* riznykh henetychnykh hrup. [Correction of rhizobial groups of the soil with the introduction of *Bradyrhizobium japonicum* of different genetic groups]. *Agroecological journal*. 2018. 2. P. 73–81.
244. Davranov K., Shurigin V., Samadiy S., Djalolova B. The Conception of Microbial Preparations Development for a Crop Production. *Mikrobiolohichnyy Zhurnal*. 2021. 83(1). P. 87–100.
245. Andrić S., Meyer T., Ongena M. *Bacillus* Responses to Plant-Associated Fungal and Bacterial Communities. *Front. Microbiol.*, 23 June 2020. Sec. Microbial Symbioses Volume 11.
246. Kumar J., Brahmachari Joshi G., Kumar V., Brahmachari S. K. Screening and identification of novel halotolerant bacterial strains and assessment for insoluble

- phosphate solubilization and IAA production. *Bulletin of the National Research Centre*. 2021. 45(1). P. 1–12.
247. Wang J., Li R., Zhang H., Wei G., Li Z. Beneficial bacteria activate nutrients and promote wheat growth under conditions of reduced fertilizer application. *BMC Microbiology*. 2020. 20. P. 1–12.
248. Peng J., Ma J., Wei X., Zhang C., Jia N., Wang X., Wang E.T., Hu D., Wang Z. Accumulation of beneficial bacteria in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) grown in a saline soil in responding to a consortium of plant growth promoting rhizobacteria. *Annals of Microbiology*. 2021. 71(1). P. 1–12.
249. Skorocho I. A., Ulziijargal E., Kurdish I. K., Gorgo Yu. P. Influence of a nanocomposite biological product of Azogran on barley seeds exposed to oxidative stress. *Scientific Light*. 2020. 1(36). P. 10–14.
250. Verbon E. H., Liberman L. M. Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends in Plant Science*. 2016. 21. P. 218–229.
251. Olanrewaju O. S., Glick B. R., Babalola O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017. 33(11). P. 197–204.
252. Ortiz-Castro R., Contreras-Cornejo H. A., Macias-Rodriguez L., Lopez-Bucio J. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling and Behavior*. 2009. 4(8). P. 701–712.
253. Raaijmakers J. M, Mazzola M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 2012. 50. P. 403–424.
254. Крючкова Л. О., Гладу, Г. О., Драговоз І. В. та ін. Вплив регуляторів росту природного походження на індукцію стійкості проти церкоспорельозу у проростків озимої пшениці. *Физиол. и биохим. культ. раст.* 2005. 37(5). С. 422–428.
255. Пат. України No 57269 А МКИ4 С05711/08 Спосіб одержання гранульованих бактеріальних препаратів Курдиш І. К., Рой А. О., Бега З. Т. Опубл. 16.06.2003, Бюл. № 6.

256. Kanchiswamy C. N., Malnoy M., Mafei M. E. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Front Plant Sci.* 2015. 6. P. 151.
257. Vacheron J., Desbrosses G., Boufaud M. L., Touraine B., Moenne Loccoz Y., Muller D., Legendre L., Wisniewski-Dye F., Prigent-Combaret C. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci.* 2013. 4. P. 356.
258. Xie X., Zhang H., Pare P. W. Sustained growth promotion in arabidopsis with long-term exposure to the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03). *Plant Signal Behav.* 2009. 4. P. 948–953.
259. Shtenikov M. D., Ostapchuk A. M., Vasylieva N. Y. Characteristics of genome of *Bacillus velezensis* ONU 553 strain isolated from the bottom sediments of the Black Sea. *Microbiological journal.* 2020. 82(3).
260. Borriss R. Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents. *Bacteria in agrobiology: plant growth responses.* 2011. P. 41–76.
261. Turner T. R., James E. K., Poole P. S. The plant microbiome. *Genome Biol.* 2013. Vol. 14. Art. 209.
262. Dunlap C. A., Bowman M. J., Rooney A. P. Iturinic lipopeptide diversity in the *Bacillus subtilis* group-important antifungals for plant disease biocontrol applications. *Front. Microbiol.* 2019. 10. P. 1794.
263. Bridier A., Le Coq D., Dubois-Brissonnet F., Thomas V., Aymerich S., Briandet R. The Spatial Architecture of *Bacillus subtilis* Biofilms Deciphered Using a Surface-Associated Model and In Situ Imaging. Driks A, editor. *PLoS ONE.* 2011. 6. e16177.
264. Shemesh M., Chai Y. A. Combination of Glycerol and Manganese Promotes Biofilm Formation in *Bacillus subtilis* via Histidine Kinase KinD Signaling. *J. Bacteriol.* 2013. 195. P. 2747–2754.
265. Gingichashvili S., Duanis-Assaf D., Shemesh M., Featherstone J. D. B. Feuerstein O., Steinberg D. The Adaptive Morphology of *Bacillus subtilis* Biofilms: A Defense Mechanism against Bacterial Starvation. *Microorganisms.* 2020. 8. P. 62.

266. Елисеев А. Особенности биосинтеза поверхностно-активных липидов культурой *Bacillus* sp. Елисеев, А., Шульга, Е. А.П., Карпенко, В. *Микробиологический журнал*. 1990. 3. С. 41–44.
267. Arima K., Kakinuma A., Tamura G. A crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1968. 31. P. 488–494.
268. Cooper D. G., MacDonald C. R., Duff S. F. B., Kosaric N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981. 42. P. 408–412.
269. Patel S., Gupta R. S. A Phylogenomic and Comparative Genomic Framework for Resolving the Polyphyly of the Genus *Bacillus*: Proposal for Six New Genera of *Bacillus* Species, *Peribacillus* Gen. Nov., *Cytobacillus* Gen. Nov., *Mesobacillus* Gen. Nov., *Neobacillus* Gen. Nov., *Metabacillus* Gen. Nov. and *Alkalihalobacillus* Gen. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. 70. P. 406–438.
270. Parte A. C. LPSN—List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (Bacterio.Net), 20 Years On. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. 68. P. 1825–1829.
271. Logan N. A., Berge O., Bishop A.H., Busse H. J., De Vos P., Fritze D., Heyndrickx M., Kämpfer P., Rabinovitch L., Salkinoja-Salonen M.S., et al. Proposed Minimal Standards for Describing New Taxa of Aerobic, Endospore-Forming Bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. 59. P. 2114–2121.
272. Bremer E., Calteau A., Danchin A., Harwood C., Helmann J. D., Médigue C., Palsson B. O., Sekowska A., Vallenet D., Zuniga A., Zuniga C. A model industrial workhorse: *Bacillus subtilis* strain 168 and its genome after a quarter of a century. *Microb Biotechnol.* 2023. Jun, 16(6). P. 1203–1231.
273. Akanuma G., Kawamura F., Watanabe S., Watanabe M., Okawa F., Natori Y. et al. Evolution of ribosomal protein S14 demonstrated by the reconstruction of chimeric ribosomes in *Bacillus subtilis* . *Journal of Bacteriology*, 2021. 203. e00599–e00520.
274. Singh P.K., Chittipurna A., Sharma V., Patil P.B., Korpole S. Identification, Purification and Characterization of Laterosporulin, a Novel Bacteriocin Produced by *Brevibacillus* sp. Strain GI-9. *PLoS One*. 2012. 7.

275. Sansinenea E., Ortiz A. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnol Lett.* 2011. 33. P. 1523–1538.
276. Кондрашевська К. Р., Ключка І. В., Пирог Т. П., Пенчук Ю. М. Розмаїття мікробних вторинних метаболітів. *Наукові праці НУХТ.* 2018. 24(5). С. 44–60.
277. Arrebola E., Jacobs R., Korsten L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 2010. 108(2). P. 386–395.
278. Liu B., Huang L., Buchenauer H., et. al. Isolation and partial characterization of an antifungal protein from the endophytic *Bacillus subtilis* strain EDR4. *Pestic. Biochem. Phys.* 2010. 98(2). P. 305–311.
279. Yu X., Ai C., Xin L., Zhou G. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper. *Eur. J. Soil Biol.* 2011. 47. P. 138–145.
280. Khan A., Gupta A., Singh P., Mishra A. K., Ranjan R. K., Srivastava A. Siderophore-assisted cadmium hyperaccumulation in *Bacillus subtilis*. *Int. Microbiol.* 2020. 23. P. 277–286.
281. Lemfack M. C., Nickel J., Dunkel M., Preissner R., Piechulla B. mVOC: A database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res.* 2014. 42. D744–D748.
282. Schulz-Bohm K., Martín-Sánchez L., Garbeva P. Microbial Volatiles: Small Molecules with an Important Role in Intra- and Inter-Kingdom Interactions. *Front. Microbiol.* 2017. 8. P. 2484.
283. Xie S., Liu J., Gu S., Chen X., Jiang H., Ding T. Antifungal activity of volatile compounds produced by endophytic *Bacillus subtilis* DZSY21 against *Curvularia lunata*. *Ann. Microbiol.* 2020. 70. P. 2.
284. Xie S., Zang H., Wu H., Uddin Rajer F., Gao X. Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus strain* D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol. Plant Pathol.* 2018. 19. P. 49–58.
285. Kai M. Diversity and Distribution of Volatile Secondary Metabolites Throughout *Bacillus subtilis* Isolates. *Front. Microbiol.* 2020. 11. P. 559.

286. Plumridge A., Hesse S. J. A., Watson A. J., Lowe K. C., Stratford M., Archer D. B. The weak acid preservative sorbic acid inhibits conidial germination and mycelial growth of *Aspergillus niger* through intracellular acidification. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. 70. P. 3506–3511.
287. Kaddes A., Fauconnier M. L., Sassi K., Nasraoui B., Jijakli M. H. Antifungal Properties of Two Volatile Organic Compounds on Barley Pathogens and Introduction to Their Mechanism of Action. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2019. 16. P. 2866.
288. Kunova A., Pizzatti C., Cortesi P. Impact of tricyclazole and azoxystrobin on growth, sporulation and secondary infection of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Pest Manag. Sci.* 2013. 69. P. 278–284.
289. Park S. H., Elhiti M., Wang H., Xu A., Brown D., Wang A. Adventitious root formation of *in vitro* peach shoots is regulated by auxin and ethylene. *Scientia Horticulturae.* 2017. 226. P. 250–260.
290. Matsuda R., Handayani M. L., Sasaki H., Takechi K., Takano H., Takio S. Production of indoleacetic acid by strains of the epiphytic bacteria *Neptunomonas* spp. isolated from the red alga *Pyropia yezoensis* and the seagrass *Zostera marina*. *Archives of Microbiology.* 2018. 200(2). P. 255–265.
291. Shameer S., Prasad T. N. V. K. V. Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation.* 2018. 84(3). P. 603–615.
292. Rastogi G., Sani R. K. Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment. *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications.* Springer New York, 2011. P. 29–57.
293. Sharpton T. J. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Front. PlantSci.* 2014. 5. P. 209.
294. Blaud A., Menon M., Zaan B., et al. Effects of Dry and Wet Sieving of Soil on Identification and Interpretation of Microbial Community Composition. *Advances in Agronomy.* 2017. 142. P. 119–142.

295. Тонха О. Л. Молекулярно-генетична оцінка прокаріотного комплексу чорнозему типового. *Вісник аграрної науки*. 2012. 1. С. 38–41.
296. Tonkha O. L. Balayev A. D. Structure of prokaryotic complex of chernozem typical and its changes under conservation tillage. *Annals of Agrarian Science*. 2015. 13(1). P. 60–63.



## **ДОДАТКИ**

ЗАТВЕРДЖУЮ:

Директор Відокремленого підрозділу  
Національного університету біоресурсів і  
природокористування України

«Великоснітинське НДГ ім. О. Музиченка»

Михайло ШЕВЧУК

2023 р.



## АКТ

## про впровадження результатів дисертаційних досліджень у виробництво

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему:  
«Bacillus subtilis: характеристика біологічних властивостей та особливості  
мікробно-рослинної взаємодії в ризосфері пшениці озимої»,

(назва теми)

що представлена на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 20 «Аграрні  
науки та продовольство», спеціальності 201 «Агрономія»,

виконаної Гончар Анастасією Миколаївною

(П.І.Б. здобувача)

впроваджені у Відокремленому підрозділі Національного університету  
біоресурсів і природокористування України «Великоснітинське НДГ імені О.В.  
Музиченка» Фастівського району Київської  
області

(назва підприємства, де здійснювалось впровадження)

Вид впроваджуваних результатів: Виробнича перевірка ефективності  
бактеризації пшениці озимої різних сортів вітчизняної селекції новим штамом  
Bacillus subtilis H40 при вирощуванні культури в зоні Лісостепу  
України.

Обсяг впровадження: 600,0 га, сорти пшениці озимої вітчизняної селекції –  
Подільська, Богдана, Центилівка; типові чорноземи, легкосуглинкові. Рівень  
гідролітичної кислотності 5 мг/100 г ґрунту, забезпеченість основними  
елементами живлення: 104 мг/кг азоту, що легко гідролізується в ґрунті  
(підвищений, середній показник 89,6 мг/кг), підвищений вміст калію на рівні 80-  
120 мг/кг ґрунту, задовільне волого забезпечення.

Новизна отриманих результатів: Вперше проведено оцінку ефективності  
застосування заходів інокуляції новим штамом Bacillus subtilis H40 при  
вирощуванні різних сортів пшениці озимої, дослідження впливу інокулянту B.  
subtilis H40 пшениці озимої на продуктивність пшениці озимої.



Практичне впровадження / використання результатів: Показано, що застосування нового штаму *B. subtilis* H40 як інокуляційної культури при вирощуванні пшениці озимої ефективно впливає на функціональний стан рослин з ефектом рістстимулювання та стабілізації продукційного процесу, а саме: бактерізація насіння пшениці озимої сортів Подолянка, Богдана інокулянтом *B. subtilis* H40 у вигляді зрілої бактеріальної спорової суспензії забезпечила підвищення урожайності пшениці на 19,0-19,6% порівняно з контрольним варіантом без бактеризації. Сорт Богдана сформував найвищий урожай (67,8 ц/га) серед досліджених сортів пшениці озимої, що вирощувались у ВП «Великоснітинське НДГ ім. О.В. Музиченка» у період 2020-2023 рр.

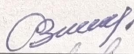
Таблиця

Варіант	Урожайність, ц/га	Приріст урожаю	
		ц/га	%
Богдана			
Контроль (без бактеризації)	56,7	—	—
Бактеризація <i>B. subtilis</i> H40	67,8	11,0	19,6
Подолянка			
Контроль (без бактеризації)	52,0		
Бактеризація <i>B. subtilis</i> H40	61,9	9,9	19,0
Центилівка			
Контроль (без бактеризації)	50,4		
Бактеризація <i>B. subtilis</i> H40	58,5	8,1	16,0

#### Підписи відповідальних за проведення впровадження:

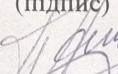
Агроном ВП НУБіП України

«Великоснітинське НДГ ім. О.В. Музиченка»

  
(підпис)

/Сергій Запольський/

Здобувач

  
(підпис)

/Анастасія ГОНЧАР/

Акт складено « 20 » листопада 2023 р.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України та виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних Scopus, Web of Science

1. Патика М. В., Тонха О. Л., Сінченко В. М., **Гончар А. М.**, Патика Т. І. Особливості формування структурово-функціонального складу мікробіому чорнозему цілинного в степу України. Мікробіологічний журнал. 2019. №81(4). С. 90–106. DOI: <https://doi.org/10.15407/microbiolj81.04.090> (Здобувачкою проведено аналіз літературних даних, мікробіологічні дослідження мікроорганізмів різних фізіологічних груп на поживних середовищах, аналіз отриманих результатів, узагальнення даних, написання та підготовка статті до друку).
2. **Гончар А. М.**, Тонха О. Л., Патика М. В., Макаrchук О. С. Особливості зміни чисельності та складу мікробіому ризосфери пшениці озимої в процесі онтогенезу. Plant And Soil Science. 2021. №12(3). С. 56–65. DOI: <https://doi.org/10.31548/agr2021.03.0056> (Здобувачкою проведено польові та лабораторні дослідження з подальшими обрахунками даних щодо показників чисельності та складу мікробіому ризосфери пшениці озимої, підготовлено статтю до друку).
3. Borko Yu. P., Patyka M. V., Boyko M. V., **Honchar A. M.**, Sinchenko V. M. The features of taxonomic structure formation of soil microbial biome in *Beta vulgaris* rhizosphere. Мікробіологічний журнал. 2022. №84(1). С. 3–14. DOI: <https://doi.org/10.15407/microbiolj84.01.003> (Здобувачкою проведено аналіз літературних даних, мікробіологічні дослідження, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку).
4. **Honchar A.**, Tonkha O., Patyka N., Lykholat Y., Patyka T. Morphological and physiological-biochemical variability of isolates of spore-forming bacteria selected from the agrocenosis of winter wheat. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2021. №12(4). С. 588–593. DOI: <https://doi.org/10.15421/022180> (Здобувачкою проведено аналіз

літературних джерел, комплекс мікробіологічних, фізіолого-біохімічних досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку).

5. **Гончар А. М.,** Пати́ка М. В. Вплив бактерій *Bacillus subtilis* на стан і активність фотосинтетичного апарату рослин пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.). Сільськогосподарська мікробіологія. 2022. №36. С. 28–35. DOI: <https://doi.org/10.35868/1997-3004.36.28-35> (Здобувачкою проведено аналіз літературних джерел, мікробіологічні, інструментальні дослідження, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку).

6. **Гончар А. М.,** Тонха О. Л., Пати́ка М. В. Особливості впливу штамів *Bacillus subtilis* на розвиток *Triticum aestivum* L. у разі застосування інокуляційних культур. Plant And Soil Science. 2023. №14(3). С. 35–46. DOI: <https://doi.org/10.31548/plant3.2023.35> (Здобувачкою проведено аналіз літературних даних, проведено модельні, мікробіологічні дослідження, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку).

#### Тези наукових доповідей

7. **Гончар А. М.,** Тонха О. Л., Пати́ка М. В. Перспективи реалізації біологічного потенціалу *Bacillus subtilis* в агроценозах злакових культур. Біотехнологія: звершення та надії: VIII Міжнародна науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених, м. Київ, 15 листопада 2019 року: тези доповіді. Київ, 2019. С. 17–18. (Здобувачкоюм опрацьовано та проаналізовано наукові джерела та підготовлено матеріали до друку).

8. **Гончар А. М.,** Тонха О. Л., Пати́ка М. В. Дослідження мікробних ізолятів з ризосфери пшениці озимої різних сортів вітчизняної селекції. Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві: Наукова конференція молодих вчених, м. Чернігів, 27-28 жовтня 2020 року: тези доповіді. Чернігів, 2020. С. 78. (Здобувачкою проведено польові та лабораторні дослідження щодо мікробіологічного аналізу ізолятів, виділених з ризосфери пшениці озимої, підготовлено матеріали до друку).

9. **Гончар А. Н.**, Тонха О. Л., Патыка Н. В. Сигналинг и полифункциональность ризосферных бактерий *Bacillus subtilis* в посевах пшеницы. Биологически активные препараты для растениеводства: научное обоснование – рекомендации – практические результаты, daRostim: XVI Международная научно-практическая конференция, г. Минск, 22 октября 2020 года: тезисы доклада. Минск, 2020. С. 55–57. *(Здобувачкою опрацьовано та проаналізовано наукові джерела, проведено комплекс мікробіологічних досліджень та підготовлено матеріали до друку).*

10. Borko Yu., **Honchar A.** Microbial transformation of carbon compounds in chernozem typical at the different agricultural use. Молодь та сучасні проблеми мікробіології і вірусології (Youth and modern problems of microbiology and virology): Науково-практична конференція молодих дослідників, м. Київ, 23–26 листопада 2020 року: тези доповіді. Київ, 2020. С. 8. *(Здобувачкою опрацьовано та проаналізовано наукові джерела, проведено мікробіологічні дослідження та підготовлено матеріали до друку).*

11. **Гончар А. М.**, Тонха О. Л., Патики М. В. Мікробіом ризосфери пшениці озимої та бактерії *Bacillus subtilis* – продуценти біоактивних сполук. Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур: IX Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених і спеціалістів, с. Центральне, 23 квітня 2021 року: тези доповіді. Центральне, 2021. С. 33. *(Здобувачкою проведено польові та лабораторні дослідження щодо аналізу мікробіому ризосфери пшениці озимої, підготовлено матеріали до друку).*

12. Борко Ю. П., Бойко М. В., **Гончар А. М.** Вплив агрозаходів на динамку показників родючості ґрунту в агроценозі буряка цукрового. Збалансоване управління ґрунтовими ресурсами – запорука сталого розвитку агросфери: Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених та спеціалістів, м. Харків, 2–3 червня 2021 року: тези доповіді. Харків, 2021. С. 17–19. *(Здобувачкою опрацьовано та проаналізовано наукові джерела та підготовлено матеріали до друку).*



13. **Гончар А. М.**, Тонха О. Л., Патика М. В. Варіабельність мікробіому ризосфери пшениці озимої в процесі онтогенезу. Біологічні аспекти оптимізації продукційного процесу культурних рослин: Всеукраїнська науково-практична онлайн-конференція, яка присвячена 60-річчю створення ІСМАВ НААН, м. Чернігів, 25 жовтня 2021 року: тези доповіді. Чернігів, 2021. С. 60–62. *(Здобувачкою опрацьовано та проаналізовано наукові джерела, проведено мікробіологічні, інструментальні дослідження мікробіому різних сортів пшениці озимої та підготовлено матеріали до друку).*

#### **Науково-методичні рекомендації**

14. Патика М. В., Патика Т. І., **Гончар А. М.** Рациональне застосування мікробних препаратів на основі бактерій роду *Bacillus* для контролю шкочочинних організмів: [науково-методичні рекомендації]. Київ, 2019. 34 с. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їх узагальнення і підготовлено матеріали до друку).*

15. Патика М.В., Тонха О.Л., Патика Т.І., **Гончар А.М.** Методичні рекомендації молекулярно-біологічної оцінки ґрунтового біому, об'єктів навколишнього середовища та детекція прокаріот: [науково-методичні рекомендації]. Київ, 2022. 52 с. *(Здобувачем проведено аналіз та узагальнення матеріалів, підготовлено рекомендації до друку).*

16. Патика М.В., Тонха О.Л., Волкогон В.В., Патика Т.І., **Гончар А.М.**, Волкогон К.І. Науково-методичні рекомендації з використання систем землеробства для оптимізації мікробіологічної складової ґрунту: [науково-методичні рекомендації]. Київ, 2022. 37 с. *(Здобувачем проведено аналіз та узагальнення експериментальних даних, підготовлено матеріали до друку).*