

**СКРИНІНГ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДІВ *BACILLUS* І *PSEUDOMONAS*,
АКТИВНИХ ПРОТИ ФІТОПАТОГЕНІВ РОДУ *FUSARIUM***

І. Страшнова, Г. Ямборко*

*Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса 65082, Україна
e-mail: jamborkoann@ukr.net*

Одним із найперспективніших напрямів у боротьбі зі збудниками захворювань рослин є використання біопрепаратів на основі бактерій родів *Bacillus* і *Pseudomonas*. Відомо досить багато препаратів на основі цих мікроорганізмів, проте в деяких випадках їхнє застосування характеризується недостатньою активністю проти збудників хвороб, а також скороченням чисельності сапрофітної ґрунтової мікробіоти, що негативно впливає на фітосанітарний стан ґрунту і знижує врожайність. Мета роботи - дослідити антагоністичну активність окремих представників родів *Bacillus* і *Pseudomonas* із різних біотопів стосовно фітопатогенних фузарій, виділених з ураженої озимої пшениці, вирощеної в Одеській області. Найбільшу кількість штамів бацил і псевдомонад було виділено із ризосферної зони рослин. Скринінг антагоністично активних бактерій показав, що ця властивість притаманна 92,4 % штамів *Bacillus* spp. та 73,5 % – *Pseudomonas* spp. *Bacillus* spp. R14, R31 і S19 пригнічували ріст усіх виділених фузарій (зони відсутності росту перевищували 20 мм). *Pseudomonas* spp. WR5 і WR7 також проявили антимікотичний ефект, але розміри зон відсутності їхнього росту були менше 20 мм. Попереднє культивування антагоністично активних бактерій родів *Bacillus* і *Pseudomonas* на органічних поживних середовищах сприяло кращому прояву антимікотичної активності метанолових екстрактів вторинних метаболітів досліджених штамів.

Визначення мінімальних інгібуючих концентрацій (МІК) екстрагованих метаболітів щодо виділених штамів фузарій показало, що значення були варіабельними і коливалися в діапазоні від 1 мг/мл до 4 мг/мл залежно від конкретного штаму антагоніста і патогена. Для визначення спектру і профілю вторинних метаболітів антагоністично активних штамів *Bacillus* spp. R14, S19 і *Pseudomonas* sp. WR5 необхідне проведення більш повномасштабних досліджень, включаючи мас-спектрометрію з високою роздільною здатністю, а також проведення повного секвенування й анотації геномів цих штамів для їхньої точної видової ідентифікації та виявлення кластерів вторинних метаболітів.

Ключові слова: фітопатогенні фузарії, бактерії-антагоністи *Bacillus* spp. та *Pseudomonas* spp., біологічний захист зернових культур

В умовах сьогодення пшениця озима визначає продовольчу безпеку нашої країни та є домінуючою зерновою культурою аграрного виробництва, саме тому підвищення ефективності зернового комплексу – це одна із глобальних директив розвитку аграрного сектору України [4, 5]. Урожайність і якість насіння пшениці залежать від багатьох чинників, серед яких суттєва роль належить хворобам зерна, що обмежують потенційну продуктивність сортів озимої пшениці [2, 6]. Особливої шкоди завдає фузаріоз. Зараження зерна пшениці мікопатогенами роду *Fusarium* призводить до зниження урожайності, зменшує проростання і схожість насіння, погіршує його хлібопекарську якість [9]. Через

поширення фузаріозу зернових культур у всьому світі й через небезпеку, яку він несе, гостро постає питання боротьби зі збудниками хвороби. Підхід у боротьбі зі збудниками фузаріозу має бути комплексним, починаючи від захисту насінини у ґрунті до кількох обробок у період вегетації. Привабливим і перспективним як з погляду вартості, так і з погляду екологічної безпеки, є розробка та впровадження біологічних засобів боротьби з фузаріями [9]. Одними із можливих кандидатів у боротьбі та профілактиці мікопатогенів роду *Fusarium* є представники родів *Bacillus* і *Pseudomonas*, арсенал вторинних метаболітів яких досить великий і різноманітний [3, 15].

Мета даної роботи - провести виділення і скринінг штамів бактерій родів *Bacillus* і *Pseudomonas*, активних проти мікопатогенів роду *Fusarium*, котрі виявлено у насіннєвому матеріалі озимої пшениці. У задачі дослідження входило: виділити із природних джерел штами бактерій родів *Bacillus* і *Pseudomonas*, потенційних антагоністів фузарій, встановити частоту виділення їх і дослідити біологічні властивості; визначити антагоністичну активність виділених штамів бацил і псевдомонад щодо мікопатогенів роду *Fusarium*, провести скринінг найактивніших штамів-антагоністів; дослідити активність вторинних екзометаболітів відібраних штамів *Bacillus* spp. і *Pseudomonas* spp. та визначити їхні мінімальні інгібуючі концентрації щодо виділених штамів фузарій.

Матеріали та методи

Для виділення антагоністично активних мікроорганізмів використовували зразки ґрунтів, відібраних на полях Одеської області, ризосфери, коріння, насіння інфікованих і здорових рослин, листя і рослинних залишків озимої пшениці, уражених фузаріозом. Для виділення антагоністів із проб ґрунтів і ризосферної зони пшениці готували суспензії методом послідовних 10-кратних розведень, після чого по 100 мкл у розведенні 10^{-7} висівали на поверхню картопляно-декстрозного (глюкозного) агару (КГА) (Potato Dextrose Agar, Hi-Media Laboratories Private Limited, India), середовища Кінг В (Dansk Standard, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) та поживного агару (ПА) (GranuCult® Nutrient Agar, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) в чашках Петрі. Для виділення бактерій із коріння, насіння, листя й рослинних залишків відібрані зразки 30 с обробляли 70° розчином етилового спирту з подальшим промиванням стерильною водою, після чого зразки розтирали у стерильній ступці та готували 10-кратні розведення. По 100 мкл суспензій у розведенні 10^{-5} сіяли на поверхню середовища Кінг В і поживного агару в чашках Петрі. Культивували за температури 28 °С протягом 4 діб. Після цього проводили виділення чистих культур шляхом відсіву окремих колоній методом виснажливого штриху, застосовуючи такі самі середовища, як для виділення. Чисті культури використовували для подальших досліджень і зберігали за 4 °С. Біохімічні властивості ізольованих штамів вивчали за допомогою тестів API bioMérieux (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France), відповідно до інструкції виробника [APIWEB™]. Біохімічні властивості бактерій роду *Bacillus* досліджено за допомогою тест-системи API 50 CHB, *Pseudomonas* – за допомогою API 20 NE. Інтерпретацію результатів проводили візуально та розшифровували за допомогою бази даних APIWEB [APIWEB™].

Виділення фузарій і проведення родової та видової ідентифікації ізольованих штамів здійснювали традиційними методами [14]. За дослідженими морфологічними (в першу чергу, типів і форм спор, конідій і гіф), культуральними, тінкторіальними, фізіологічними і біохімічними властивостями робили припущення про залучення мікроміцетів до певної систематичної групи. Біохімічні властивості вивчали за допомогою тестів API bioMérieux (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France), відповідно до інструкції виробника [APIWEB™]. Інтерпретацію результатів проводили візуально та розшифровували за допомогою бази

даних APIWEB [APIWEB™]. У скринінгу на антимікотичну активність виділених штамів бактерій застосовували метод блоків [12], як індикаторні фітопатогенні мікроорганізми були використані 3 штами грибів роду *Fusarium*: *F. proliferatum* Se4, *F. oxysporum* Se11 і *F. graminearum* Se1, виділених із ураженої пшениці. Контролями слугували чашки, засіяні відповідними штамми фузарій без накладання блоків.

Для отримання неочищених екстрактів вторинних метаболітів штами *Bacillus* spp. і *Pseudomonas* spp. культивували на ПА та середовищі Кінг В, відповідно, протягом 7 днів. Щоби з'ясувати вплив складу середовища на активність екстрактів експеримент проведено у двох варіантах: 1) біомасу культур, що вирости на поживних середовищах, переносили у колби зі 100 мл рідких органічних середовищ: поживний бульйон (ПБ) (GranuCult® Nutrient Broth, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) – для вирощування бацил, Кінг В – для псевдомонад; 2) маніпуляції були такі самі, як у першому варіанті, але замість органічних середовищ використовували мінеральні – для бацил Гаузе 1 [1], для псевдомонад – Тар [17]. Колби інкубували за 28 °C на ротарному шейкері, постійно перемішуючи за 150 об/хв протягом 72 год. Бульйонну культуру штамів фільтрували через стерильний фільтрувальний папір, а потім супернатант центрифугували за 6000 об/хв протягом 20 хв і стерилізували через фільтри Millipore 0,45 мкм для видалення бактеріальних клітин.

Безклітинні супернатанти підкислювали до pH 2 концентрованою HCl для осадження вторинних метаболітів, витримували протягом 16 год за 4 °C і центрифугували за 10 000 об/хв протягом 20 хв. Осад вилучали і тричі екстрагували 10 мл 100 % метанолу (MeOH) [19]. Метанолові неочищені екстракти упарювали на ротарному випарнику, повторно розчиняли в 1 мл чистого MeOH, фільтрували через фільтр 0,2 мкм і зберігали за -80 °C для подальших досліджень. Антагоністичну активність екстрактів щодо фузарій вивчали методом лунок [19]. Для цього отримані екстракти розморожували, розводили чистим метанолом до концентрації 8 мг/мл і вносили по 50 мкл в лунки картопляно-декстрозного (глюкозного) агару, засіяного штамми фузарій, у контрольну лунку вносили таку ж кількість стерильного метанолу. Оцінку результатів проводили через 10 діб після інкубації за 28 °C, вимірюючи розміри зон відсутності росту фузарій.

Для визначення мінімальних інгібуючих концентрацій (МІК) щодо виділених штамів *Fusarium* spp. застосовували клітинні метанолові екстракти бацил і псевдомонад у концентраціях 8, 4, 2, 1 мг/мл.

Для аналізу отриманих результатів проведено описову статистику, яку здійснювали за допомогою програми Microsoft Office Excel-2016.

Результати і їхнє обговорення

Проблема боротьби зі збудниками фузаріозу є досить актуальною [7, 16]. Одним із перспективних і відносно безпечних напрямів у вирішенні цієї проблеми є створення біологічних препаратів на основі біологічно активних штамів мікроорганізмів. За даними літератури, найперспективнішими в боротьбі з фітопатогенними мікоміцетами є представники родів *Bacillus* і *Pseudomonas*, які продукують різноманітні антимікробні речовини [13, 15, 18]. Тому першим етапом роботи було виділення штамів бацил і псевдомонад із різних природних джерел (зразків ґрунтів, ризосфери, коріння, насіння та рослинних залишків озимої пшениці). У результаті проведеної роботи виділено і доведено до мікробіологічної чистоти 113 штамів бактерій, у яких вивчали основні біологічні властивості, необхідні для проведення родової ідентифікації.

Більшість виділених культур були грампозитивними паличками, що мали заокруглені кінці, через 24–48 год культивування в аеробних умовах на КГА і ПА у мікроскопічних препаратах спостерігали палички, що утворюють ендоспори й окремі

ендоспори (рис. 1а). Під час мікроскопії прижиттєвих препаратів встановлено, що палички у більшості випадків були рухливими. На КГА ізоляти утворювали щільні колонії округлої форми, слизові, блискучі, білого або кремового кольору з випуклим профілем розміром до 10 мм. На ПА колонії були середнього розміру (від 1 мм до 10 мм) та великі (більше 10 мм), щільні, блискучі або матові, слизові, профіль – випуклий, напіввипуклий або плоский. Через 48 год культивування змінювалася поверхня колоній, вони ставали зморшкуватими або складчастими (здебільшого на КГА) (рис. 1б).

Клітини інших культур бактерій були представлені грамнегативними паличками, у мікроскопічних препаратах вони розміщувались поодинокі або парами, спор не утворювали (рис. 2а). У нефікованих препаратах спостерігали рух клітин. Росли на всіх трьох поживних середовищах (ПА, КГА і Кінг В) в аеробних умовах. Колонії, що росли на ПА, мали розміри до 6 мм, були округлої або неправильної форми. Профіль колоній опуклий, поверхня гладка, блискуча, структура однорідна, консистенція слизова.

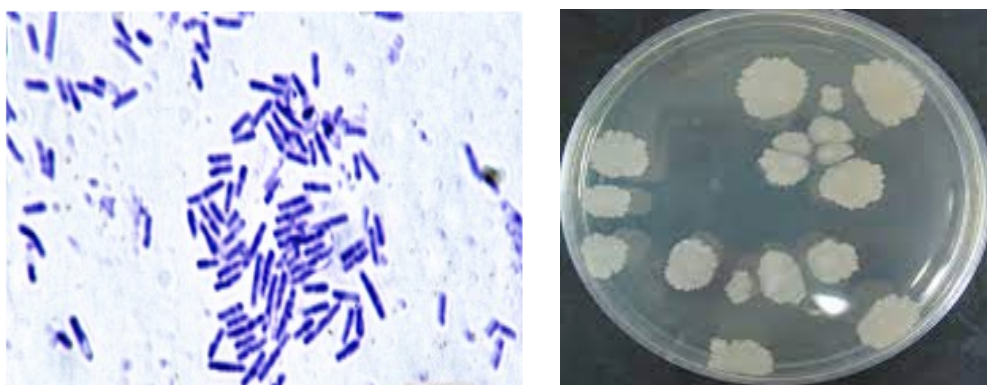


Рис. 1. Морфологія клітин (а) і колоній на КА (б) виділеного штаму *Bacillus* sp. S19

На середовищі Кінг В бактерії утворювали блискучі колонії з жовто-зеленим флюоресцентним пігментом, що дифундує в середовище, забарвлюючи його і колонії (рис. 2б). Бактерії мали каталазну й оксидазну активність. Штами бактерій з такими властивостями залучили до роду *Pseudomonas*.

У результаті проведеної роботи виділено, доведено до мікробіологічної чистоти й ідентифіковано 79 штамів бактерій роду *Bacillus* і 34 штами бактерій роду *Pseudomonas*.

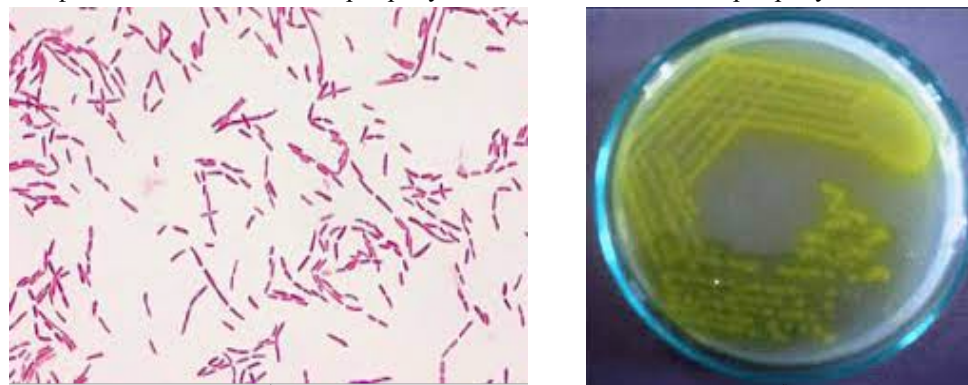


Рис. 2. Морфологія клітин (а) і колоній на Кінг В (б) виділеного штаму *Pseudomonas* sp. L7

Найбільшу кількість штамів виділено із ризосферної зони рослин – 45 штамів (36 і 9 штамів бактерій родів *Bacillus* і *Pseudomonas*, відповідно) (рис. 3). На наш погляд, це пов'язано з наявністю в даному джерелі великої кількості поживних речовин у доступній для бактерій формі. Із зразків ґрунту виділено меншу кількість штамів (25 і 11 штамів бактерій родів *Bacillus* і *Pseudomonas*, відповідно).

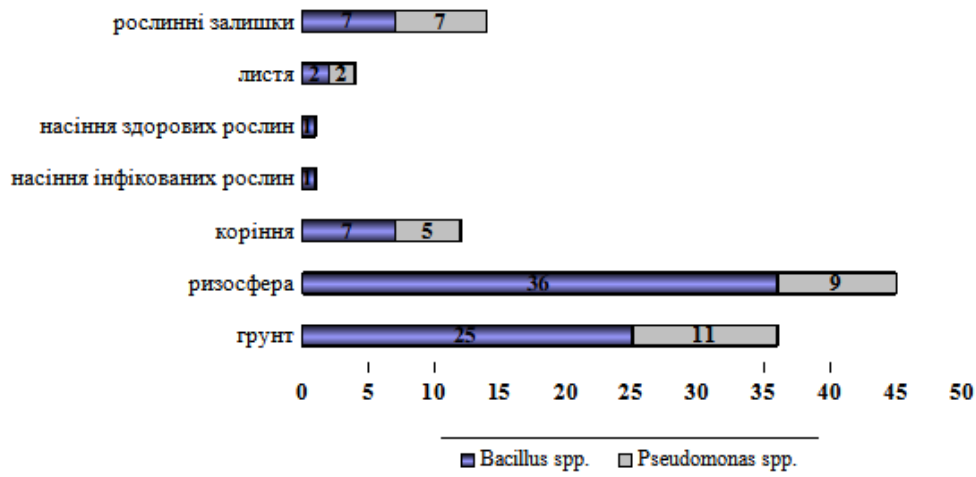


Рис. 3. Кількість штамів бактерій, виділених із різних природних джерел

Перспективність використання штамів родів *Bacillus* і *Pseudomonas* у захисті рослин оцінюють, перш за все, за їхньою антагоністичною активністю щодо фітопатогенів [8, 11]. Під час проведення первинного скринінгу всі виділені штами бацил і псевдомонад було протестовано на здатність проявляти антагоністичну активність проти виділених штамів грибів роду *Fusarium*. Переважна більшість виділених штамів родів *Bacillus* і *Pseudomonas* проявили антагонізм хоча б до одного штаму фузарій. Із бацил антагоністичну активність мали 73 із 79 виділених штамів, що становило 92,4 % штамів, із псевдомонад така властивість була притаманна 73,5 % штамів.

Під час оцінки й аналізу отриманих результатів підтверджено певні закономірності, до яких привертають увагу багато дослідників у відповідних публікаціях [8, 18]. По-перше, антагоністична активність залежить від джерела виділення мікроорганізмів-антагоністів і властива не тільки конкретним видам, але й конкретним штамам цих видів (зокрема, ступінь її прояву). По-друге, чутливість збудників також залежить від штаму, що спричинив захворювання. По-третє, прояв активності залежить від умов навколишнього середовища. Окрім цього, як у штамів мікроорганізмів-антагоністів може слабшати дана ознака, так і штами збудників можуть формувати механізми стійкості до антибіотичних речовин продуцентів.

У результаті вторинного скринінгу відібрано 11 штамів бацил і 12 штамів псевдомонад, які проявили антагоністичну активність до штамів мікоміцетів, узятих в експеримент. У табл. 1 і 2 наведено результати визначення розмірів зон відсутності росту індикаторних штамів *Fusarium* spp. за дії вторинних метаболітів ізольованих штамів *Bacillus* spp. і *Pseudomonas* spp.

Серед відібраних бацил найбільше було штамів, виділених із ризосфери (R14, R27, R31, R33, R35) і ґрунту (S4, S17, S19), і саме вони проявили найкращу антагоністичну

активність щодо всіх виділених штамів фузарій. Для подальшої роботи відібрали штами *Bacillus* spp. R14, R31 і S19, ізольовані, відповідно, із ризосфери і ґрунту, за дії метаболітів яких зони відсутності росту всіх фузарій перевищували 20 мм, що свідчить про їхній значний антагоністичний потенціал.

Таблиця 1

Антагоністична активність досліджених штамів *Bacillus* spp.
щодо фітопатогенних фузарій

Виділені штами	Зони відсутності росту <i>Fusarium</i> spp., мм										
	R14	R27	R31	R33	R35	S4	S17	S19	Ro2	Ro3	Re1
<i>F. graminearum</i>	20,63±	19,81±	20,44±	19,41±	19,32±	18,84±	19,13±	20,42±	15,31±	15,21±	14,11±
Se4	0,03	0,02	0,02	0,01	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02
<i>F. oxysporum</i>	20,22±	19,21±	20,43±	19,42±	20,22±	18,53±	19,45±	20,56±	16,11±	15,33±	16,0±
Se11	0,03	0,03	0,02	0,03	0,01	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02	0,03
<i>F. proliferatum</i>	20,43±	19,12±	20,45±	19,57±	18,67±	19,77±	19,23±	20,45±	16,24±	15,09±	15,23±
Se1	0,03	0,02	0,03	0,03	0,02	0,03	0,01	0,02	0,03	0,02	0,03

Примітка: $p \leq 0,05$, $n=3$

Натомість за дії навіть найактивніших антагоністів серед псевдомонад розміри зон відсутності росту фузарій були менші, ніж за дії антагоністично найактивніших штамів бацил. Відібрані штами *Pseudomonas* spp., які пригнічували ріст усіх фузарій, були виділені із ризосфери, ґрунту і коріння. Серед досліджених 12 штамів найвищою антагоністичною активністю характеризувалися штами *Pseudomonas* spp. WR5 і WR7, виділені з ґрунту. За дії вторинних метаболітів цих штамів розміри зон відсутності росту всіх фузарій перевищувала 16 мм.

Таблиця 2

Антагоністична активність досліджених штамів *Pseudomonas* spp.
щодо фітопатогенних фузарій

Виділені штами	Зони відсутності росту <i>Fusarium</i> spp., мм											
	WR2	WR3	WR5	WR7	WR8	WR9	WS2	WS4	WS11	WRo1	WRo4	WRo5
<i>F. graminearum</i>	15,14±	14,98±	16,48±	16,76±	15,12±	14,28±	15,02±	14,78±	13,98±	14,27±	11,27±	11,84±
Se4	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02
<i>F. oxysporum</i>	16,12±	13,15±	16,51±	16,82±	15,44±	14,89±	16,21±	14,64±	14,55±	14,45±	12,24±	12,12±
Se11	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02
<i>F. proliferatum</i>	15,78±	14,34±	16,40±	16,54±	15,65±	13,76±	15,34±	15,10±	14,87±	14,84±	11,67±	12,43±
Se1	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01

Примітка: $p \leq 0,05$, $n=3$

Як видно з отриманих даних, розміри зон відсутності росту *Fusarium* spp. були досить варіабельними і коливалися від 14,11±0,02 мм до 20,63±0,03 мм за дії екзотметаболітів *Bacillus* spp. та від 11,27±0,02 мм до 16,82±0,02 мм за впливу екзотметаболітів *Pseudomonas* spp.

Отже, у результаті послідовного скринінгу для подальших досліджень було відібрано 3 штами бактерій роду *Bacillus* spp. R14, R31 і S19 і 2 штами бактерій роду *Pseudomonas* spp. WR5 і WR7.

Наступним етапом було отримання неочищених екстрактів вторинних метаболітів відібраних штамів і дослідження їхньої активності щодо виділених фузарій. З урахуванням того, що одним із чинників, які впливають на інтенсивність антагоністичної активності, є склад середовища культивування, то для отримання екстрактів штамів-антагоністів культивували на двох типах середовищ: органічних (поживному бульйоні – для вирощування бацил і Кінг В – для псевдомонад) і мінеральних (Гаузе 1 і Тар – для бацил і

псевдомонад, відповідно).

Для вивчення біологічної активності отриманих екстрактів їх розводили чистим метанолом до концентрації 8 мг/мл і вносили по 50 мкл в лунки середовища КГА, попереднього засіяного штамами трьох видів *Fusarium* spp.: *F. graminearum* Se4, *F. oxysporum* Se11, *F. proliferatum* Se1. Отримані результати, наведені у табл. 3, підтверджують дані Mona et al. [2016], Bidima et al. [2022], що синтез вторинних метаболітів (як за кількісними показниками, так і за різноманітністю їхнього складу) залежить від компонентного складу поживного середовища, на якому вирощують продуценти [11, 17]. В усіх випадках досліджені штами *Bacillus* spp. і *Pseudomonas* spp. проявили кращу антимікотичну активність під час культивування їх на органічних середовищах. Тобто композиційний склад використаних органічних середовищ сприяє накопиченню екзометаболітів штамами-продуцентами.

Таблиця 3

Антимікотична активність метанолових екстрактів екзометаболітів (8 мг/мл) штамів *Bacillus* spp. і *Pseudomonas* spp., вирощених на середовищах різного складу

Виділені штами	Зони відсутності росту <i>Fusarium</i> spp. (мм) за впливу метанолових екстрактів екзо- метаболітів бактерій-антагоністів									
	<i>Bacillus</i> sp. R14		<i>Bacillus</i> sp. R31		<i>Bacillus</i> sp. S19		<i>Pseudomonas</i> sp. WR5		<i>Pseudomonas</i> sp. WR7	
	ПБ	Гаузе I	ПБ	Гаузе I	ПБ	Гаузе I	Кінг В	Тар	Кінг В	Тар
<i>F. graminearum</i> Se4	17,46± 0,02	8,02± 0,03	15,28± 0,02	7,80± 0,02	18,45± 0,02	11,28± 0,02	15,78± 0,02	8,02± 0,01	15,83± 0,02	8,23± 0,02
<i>F. oxysporum</i> Se11	17,46± 0,02	10,11± 0,02	16,34± 0,02	8,42± 0,01	18,68± 0,02	10,44± 0,02	15,78± 0,02	7,54± 0,03	14,62± 0,02	7,81± 0,03
<i>F. proliferatum</i> Se1	18,23± 0,03	10,22± 0,03	18,41± 0,02	7,39± 0,02	18,54± 0,01	11,67± 0,02	15,95± 0,01	8,26± 0,02	15,38± 0,02	7,75± 0,02

Примітка: $p \leq 0,05$, $n=3$

Незважаючи на те, що розміри зон відсутності росту фузарій за дії екстрактів екзометаболітів бактерій-антагоністів були трохи меншими, ніж за дії біомаси продуцентів (табл. 1, 2), та все ж вони були досить значними (від 15,28±0,02 мм до 18,68±0,02 мм за дії екзометаболітів бацил і від 14,62±0,02 мм до 15,95±0,01мм за дії екзометаболітів псевдомонад). Натомість антагоністична активність досліджених штамів *Bacillus* spp. і *Pseudomonas* spp. суттєво зменшилася (приблизно у 1,5–2 рази залежно від штаму) за вирощування їх на відповідних мінеральних середовищах.

З урахуванням отриманих даних для наступного етапу роботи було відібрано два штами бацил (*Bacillus* spp. R14, S19) і один штамп псевдомонад (*Pseudomonas* sp. WR5), для метанолових екзометаболітів яких визначили мінімальні інгібуючі концентрації (МІК), тобто такі найменші концентрації екстрактів, за дії яких не спостерігали видимого росту взятих у дослід штамів мікроорганізмів-фітопатогенів. Штами-продуценти (*Bacillus* spp. R14, S19 і *Pseudomonas* sp. WR5) вирощували, відповідно, на рідких середовищах МПБ і Кінг В, отримували метанолові екстракти екзометаболітів, після чого їх розводили до концентрацій 8 мг/мл, 4 мг/мл, 2 мг/мл і 1 мг/мл і використовували у досліді. Отримані результати наведено на рис. 4.

Метанолові екстракти штамів *Bacillus* spp. R14, S19 і *Pseudomonas* sp. WR5 пригнічували ріст усіх індикаторних штамів фітопатогенів. При цьому МІК екстрактів *Bacillus* sp. R14 становив 2 мг/мл для штамів *F. graminearum* Se4 і *F. oxysporum* Se11 і 1 мг/мл – для штаму *F. proliferatum* Se1 (рис. 4а).

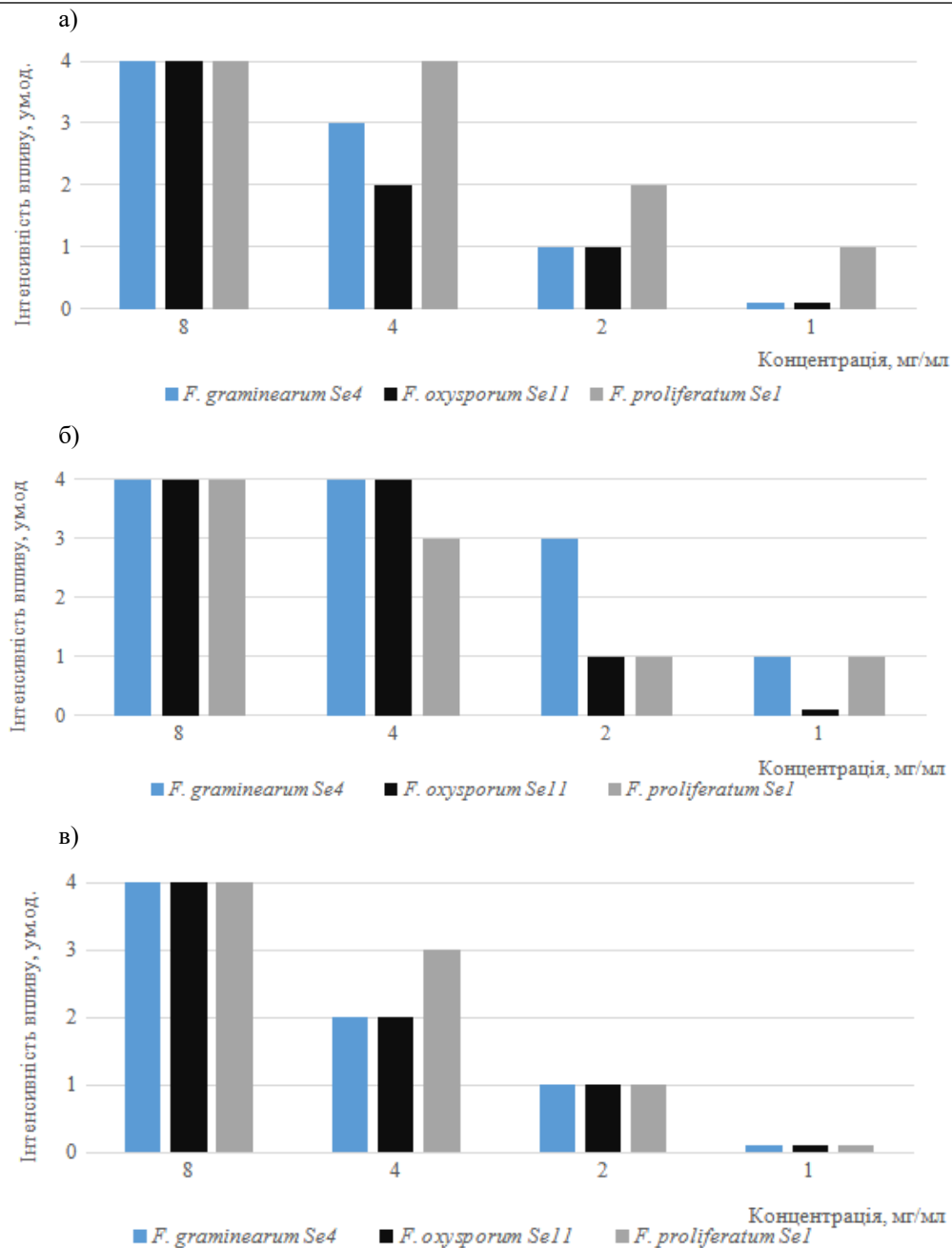


Рис. 4. Інтенсивність впливу на ріст фітопатогенів (в умовних одиницях) різних концентрацій метанолових екстрактів штамів-антагоністів: а – *Bacillus* sp. R14, б – *Bacillus* sp. S19, в – *Pseudomonas* sp. WR5.

Примітка: 4 ум. од. – розмір зони відсутності росту більше 15 мм; 3 ум. од. – розмір зони відсутності росту від 10 мм до 14 мм; 2 ум. од. – розмір зони відсутності росту від 5 мм до 9 мм; 1 ум. од. – розмір зони відсутності росту менше 4 мм; 0 ум. од. – зони відсутності росту 0 – 0,1 мм

МІК екстрактів *Bacillus* sp. S19 становили 2 мг/мл для штамів *F. oxysporum* Se11 і *F. proliferatum* Se1, 1 мг/мл – для штаму *F. graminearum* Se4 (рис. 4б). Щодо неочищених екстрактів *Pseudomonas* sp. WR5, то МІК, визначені для них, становили 2 мг/мл для всіх штамів мікопатогенів (рис. 4в).

Аналізуючи отримані результати і порівнюючи їх з даними літератури [10, 15], можна констатувати наявність у неочищених пулах екстрактів *Bacillus* spp. і *Pseudomonas* spp. метаболітів з антимікотичною активністю. Ймовірно, що серед вторинних екзометаболітів досліджених штамів бацил є полікетиди і сидерофори, і саме їм притаманна антифунгальна активність. Щодо представників роду *Pseudomonas*, то спектр екзометаболітів, які вони синтезують, досить великий і різноманітний (сидерофори, антибіотики, феназини та їхні аналоги, пігменти, органічні кислоти, ефіри та ін.) [8, 15]. Тому для визначення спектру і профілів мікробних метаболітів з антибіотичною активністю необхідні повномасштабні дослідження, включаючи мас-спектрометрію з високою роздільною здатністю, а також проведення повного секвенування й анотації геномів *Bacillus* spp. R14, S19 і *Pseudomonas* sp. WR5, що дасть змогу виявити генні кластери вторинних метаболітів і провести точну видову ідентифікацію штамів-антагоністів з перспективою застосування їх у подальшому як основи нових мікробних препаратів для захисту озимої пшениці від збудників фузаріозу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Білявська Л. О. Актинобактерії роду *Streptomyces* і їхні метаболіти у біорегуляції рослин: дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.07. К., 2018. 485 с.
2. Карпенко К. О., Рожкова Т. О., Власенко В. А. Чорний зародок та фузаріоз насіння пшениці озимої (аналітичний огляд) // Миронівський вісник. 2015. № 1. С. 170–180. http://nbuv.gov.ua/UJRN/myrbull_2015_1_18
3. Крутякова В. І., Гулич О. І., Пилипенко Л. А. Біологічний метод захисту сільськогосподарських культур: перспективи для України // Вісн. аграрної науки. 2018. №11 (788). С. 159–168. <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201811-20>
4. Моргун В. В., Дубровна О. В., Моргун Б. В. Сучасні біотехнології отримання стійких до стресів рослин пшениці // Фізіологія рослин і генетика. 2016. Т. 48. № 3. С. 196–214. http://nbuv.gov.ua/UJRN/FBKR_2016_48_3_4
5. Писаренко П. В., Матюха В. Л., Писаренко П. П. та ін. Ефективність бакових сумішей пестицидів проти шкідників та хвороб у технології вирощування пшениці озимої в північному степу України // Вісн. Полтав. держ. аграр. академії. 2021. № 1. С. 80–89. <https://doi.org/10.31210/visnyk2021.01.09>
6. Сківка Л. М., Грицев О. А., Зозуля О. Л. Моніторинг видового складу грибів роду *Fusarium* у насіннєвому матеріалі озимої пшениці на території України // Мікробіологія і біотехнологія. 2018. № 2. С. 81–89. [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2\(42\).134443](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2(42).134443)
7. Фуртат І. М., Остапюк Н. А., Антонюк М. З. Біологічні особливості та екологія представників роду *Fusarium*, збудників захворювань злаків // Наук. зап. НаУКМА. Природ. науки. 2017. Т. 197. С. 2–18. http://nbuv.gov.ua/UJRN/NaUKMApr_2017_197_3
8. Adeniji A., Babalola O. Evaluation of *Pseudomonas fulva* PS9.1 and *Bacillus velezensis* NWUMFkBS10.5 as Candidate Plant Growth Promoters during Maize-Fusarium Interaction // Plants. 2022. Vol. 11 (3). P 324. <https://doi.org/10.3390/plants11030324>
9. Alisaac E., Mahlein A. Fusarium Head Blight on Wheat: Biology, Modern Detection and Diagnosis and Integrated Disease Management // Toxins. 2023. Vol. 15 (3). P. 192. <https://doi.org/10.3390/toxins15030192>

10. Ayaz M., Cai-Hong L., Qurban A., Wei Z. et al. Bacterial and Fungal Biocontrol Agents for Plant Disease Protection: Journey from Lab to Field, Current Status, Challenges, and Global Perspectives // *Molecules*. 2023. Vol. 28 (18). P. 6735. <https://doi.org/10.3390/molecules28186735>
11. Bidima M., Chtaina N., Ezzahiri B. Antifungal activity of bioactive compounds produced by the endophyte *Bacillus velezensis* NC318 against the soil borne pathogen *Sclerotium rolfsii* Sacc. // *J. Plant Prot. Res.* 2022. Vol. 62 (4). P. 326–333. <https://doi.org/10.24425/jppr.2022.142139>
12. Caulier S., Gillis A., Colau G. Versatile antagonistic activities of soil-borne *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. against *Phytophthora infestans* and other potato pathogens // *Front. Microbiol.* 2018. Vol. 9. P. 143. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00143>
13. Fernandes M., Ribeiro T., Rouws J. Biotechnological potential of bacteria from genera *Bacillus*, *Paraburkholderia* and *Pseudomonas* to control seed fungal pathogens // *Braz. J. Microbiol.* 2021. Vol. 52 (2). P. 705–714. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00448-9>
14. Leslie J. F., Summerell B. A. The *Fusarium* Laboratory Manual. First edit. Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2006. 388 p. <https://doi.org/10.1002/9780470278376>
15. Mehmood N., Saeed M., Zafarullah S. Multifaceted Impacts of Plant-Beneficial *Pseudomonas* spp. In Managing Various Plant Diseases and Crop Yield Improvement // *ACS Omega*. 2023. Vol. 8. P. 22296–22315. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00870>
16. Mielniczuk E., Skwarylo-Bednarz B. *Fusarium* Head Blight, Mycotoxins and Strategies for Their Reduction // *Agronomy*. 2020. Vol. 10 (4). P. 509. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040509>
17. Mona S., Tharisini P., Kondragunta K. Production and biological activity of fluorescent secondary metabolite from selected *Pseudomonas* spp. // *Indian J. Appl. Microbiol.* 2016. Vol. 19 (2). P. 1–10. <https://doi.org/10.1039/b817075b>
18. Ntushelo K., Ledwaba L., Rauwane M. The Mode of Action of *Bacillus* Species against *Fusarium graminearum*, Tools for Investigation, and Future Prospects // *Toxins (Basel)*. 2019. Vol. 11 (10). P. 606. <https://doi.org/10.3390/toxins11100606>
19. Sarwar A., Brader G., Corretto E. Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity // *PLoS One*. 2018. Vol. 13 (6). P. 0198107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198107>
20. Zouari I., Jlaiel L., Tounsi S. Biocontrol activity of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain CEIZ-11 against *Pythium aphanidermatum* and purification of its bioactive compounds // *Biol. Control*. 2016. Vol. 100. P. 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.05.012>

Стаття надійшла до редакції 18.06.24

доопрацьована 03.09.24

прийнята до друку 09.09.24

**SCREENING OF BACTERIA STRAINS OF THE GENERA *BACILLUS*
AND *PSEUDOMONAS*, ACTIVE AGAINST PHYTOPATHOGENS
OF THE GENUS *FUSARIUM***

I. Strashnova, G. Yamborko

*I. I. Mechnikov National University of Odessa
2, Dvoryanska St., Odesa 65082, Ukraine
e-mail: jamborkoann@ukr.net*

The using of biological preparations based on bacteria of the genera *Bacillus* and *Pseudomonas* is one of the most promising directions in the fight against pathogens of plant diseases. Quite a lot of preparations based on these microorganisms are known, but in some cases their application is characterized by insufficient activity against pathogens, as well as a reduction of the number of saprophytic soil microbiota, which negatively affects the phytosanitary state of the soil and reduces plants' productivity. The aim of the work was to study the antagonistic activity of individual representatives of the genera *Bacillus* and *Pseudomonas* from different biotopes against phytopathogenic *Fusarium* isolates from affected winter wheat grown in the Odesa region. The largest number of *Bacillus* and *Pseudomonas* strains was isolated from the rhizosphere zone of plants.

Screening of antagonistically active bacteria showed that this property was inherent in 92.4 % of *Bacillus* strains and 73.5 % – *Pseudomonas* strains. *Bacillus* spp. R14, R31 and S19 inhibited the growth of all selected fusaria (growth inhibition zones exceeded 20 mm). *Pseudomonas* spp. WR5 and WR7 also showed an antimycotic effect, but the sizes of the growth inhibition zones were less than 20 mm. Pre-cultivation of antagonistically active bacteria of the genera *Bacillus* and *Pseudomonas* on organic nutrient media contributed to a better manifestation of antimycotic activity of methanolic extracts of secondary metabolites of the studied strains. The determination of the minimum inhibitory concentrations (MIC) of the extracted metabolites against the selected *Fusarium* strains showed that the values were variable, ranging from 1 mg/ml to 4 mg/ml depending on the specific strain-antagonist and the pathogen. To determine the spectrum and profile of secondary metabolites of antagonistically active *Bacillus* spp. R14, S19 and *Pseudomonas* sp. WR5 strains requires more extensive studies, including high-resolution mass spectrometry, as well as full sequencing and annotation of the genomes of these bacterial strains for their exact identification and detection of secondary metabolite clusters.

Keywords: phytopathogens of the genus *Fusarium*, antagonistic bacteria *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp., biological protection of grain crops