

УДК 579.266:631.461.6/
631.463
2023

АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНИХ БАКТЕРІЙ — ДЕСТРУКТОРІВ ОРГАНІЧНОЇ РЕЧОВИНИ ЩОДО ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРОМІЦЕТІВ

Л.М. Токмакова¹, Л.А. Шевченко²

^{1,2} кандидати сільськогосподарських наук
Інститут сільськогосподарської мікробіології
та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна
e-mail: ¹tokmakova_ln@ukr.net, ²shevchenkolyubov@ukr.net
ORCID: ¹0000-0001-5501-2058, ²0000-0002-2637-1999

Надійшла 10.04.2023

Мета. Дослідити здатність активних штамів целюлозолітичних бактерій проявляти антагоністичну активність до фітопатогенних мікроміцетів. **Методи.** Для визначення антифунгальної активності бактерій використовували мікробіологічний метод зустрічних культур на поживному середовищі МПА + СА. **Результати.** Досліджено здатність активних штамів целюлозолітичних бактерій *Bacillus* sp. 6488, *Bacillus* sp. 6605, *Microbacterium* sp. 6633, *Microbacterium* sp. 6634, *Pseudomonas* sp. 6650, *Bacillus* sp. 6658, *Raenibacillus polymyxa* KB проявляти антагоністичну активність щодо тест-культур фітопатогенних мікроміцетів *Fusarium culmorum* Sacc. 50716, *Alternaria alternate* (Fries) Keissl. 2857, *Nigrospora oryzae* Berk. 3000 та *Nigrospora oryzae* Berk. 5000 (із колекції відділу фізіології і систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України). Встановлено, що активні штами целюлозолітичних бактерій пригнічують розвиток *F. culmorum* 50716 — збудника фузаріозу початків кукурудзи, а також мітоспорових грибів *A. alternate* 2857, *N. oryzae* 3000 та *N. oryzae* 5000, які є збудниками нігроспорозу. Найвищий рівень пригнічення росту мікроміцетів характерний для бактерій *Bacillus* sp. 6658. Зона лізису міцелію *F. culmorum*, *N. oryzae* 3000 та *N. oryzae* 5000 становила $1,2 \pm 0,2$ см, $1,4 \pm 0,1$ см та $1,7 \pm 0,1$ см відповідно. Бактерія *Bacillus* sp. 6658 повністю пригнічує ріст фітопатогенного мікроміцета *A. alternate*, бактерія *P. polymyxa* KB — розвиток *F. culmorum* 50716 та мітоспорових грибів. *A. alternate* 2857, *N. oryzae* 3000 і *N. oryzae* 5000, *P. polymyxa* KB інгібували ріст *F. culmorum* 50716 на 82,4%, *A. alternate* 2857 — на 67,0%, *N. oryzae* 3000 — на 81,6%, а *N. oryzae* 5000 — на 77,6%. **Висновки.** Целюлозолітичні бактерії *Bacillus* sp. 6658 та *P. polymyxa* KB здатні проявляти високу антифунгальну активність щодо фітопатогенних мікроміцетів *F. culmorum* Sacc. 50716, *A. alternate* (Fries) Keissl. 2857, *N. oryzae* Berk. 3000 та *N. oryzae* Berk. 5000. Зазначені мікроорганізми є перспективними для розроблення мікробного препарату — біодеструктора, призначеного для оптимізації мінералізації-імобілізації за використання побічної продукції рослинництва.

Ключові слова: антагонізм, бактерії-антагоністи,
мікроміцети, фітопатогени, целюлозоруйнівні бактерії.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202306-02>

Одним із важливих резервів надходження органічної речовини у ґрунт є внесення соломи зернових колосових і листостеблової маси соняшнику, сорго, кукурудзи, сої та інших культур — їх ретельне подрібнення і загортання у шар ґрунту за сприятливих гідротермічних умов для перебігу мікробіологічних процесів розкладання [1, 2]. Крім того, зазначені культури можна використовувати як біологічне добриво й енергетичний матеріал, що бере участь у ґрунтоутворенні [3, 4]. Сільськогосподарське виробництво потребує розроблення агроприйомів, що забезпечать домінування в агроценозах агрономічно корисних мікроорганізмів і створюють умови для посилення процесів мінералізації-гуміфікації рослинних решток. Насамперед це такий прийом, як застосування мікробних препаратів — біодеструкторів органічної речовини, створених на основі мікроорганізмів. Вони здатні продукувати ферменти, що руйнують лігнін, целюлозу, клітковину, білки рослинних решток [5, 6] та характеризуються як високою целюлозолітичною активністю, так і здатністю до колонізації рослинних решток, обмеження розвитку шкідливих бактерій і мікроміцетів [7, 8]. Тому перспективними є дослідження можливості їх застосування як основи для створення нового продуцента целюлозолітичних ферментів.

До актуальних напрямів досліджень, що становлять особливий інтерес, належить використання агрономічно корисних ґрунтових мікроорганізмів — целюлозолітичних бактерій, які відіграють важливу роль у кругообігу вуглецю в навколишньому середовищі [9], є продуцентами речовин фітогормональної та антибіотичної дії. Вони невибагливі до умов існування, швидко розвиваються, а отже, можуть бути конкурентоспроможними в біоценозах ґрунту [10]. Нині у багатьох країнах проводять дослідження, спрямовані на створення умов для посилення процесів мінералізації-гуміфікації рослинних решток за використання мікробних препаратів — деструкторів органічної речовини. Пріоритетним

завданням сучасної сільськогосподарської мікробіології є пошук високоактивних целюлозолітичних мікроорганізмів захисної дії як потенційних біоагентів препаратів для застосування в екологічно безпечних агротехнологіях.

До найперспективніших щодо створення мікробних препаратів належать бактерії роду *Bacillus*. Вони становлять одну з основних складових мікробного угруповання ґрунту і ризосфери рослин, що здатні продукувати біологічно активні сполуки (антибіотики, токсини, літичні ферменти, сидерофори, фітогормони та вітаміни) і виявляють високий рівень антагоністичної активності до багатьох фітопатогенних грибів та мікроорганізмів [11, 12]. Дослідження здатності активних штамів целюлозолітичних бактерій проявляти антагоністичну активність щодо фітопатогенних мікроміцетів — актуальне завдання мікробіологічної промисловості.

Мета досліджень — визначити здатність активних штамів целюлозолітичних бактерій проявляти антагоністичну активність щодо фітопатогенних мікроміцетів.

Матеріали та методи досліджень. Використовували штами бактерій *Bacillus* sp. 6488, *Bacillus* sp. 6605, *Microbacterium* sp. 6633, *Microbacterium* sp. 6634, *Pseudomonas* sp. 6650, *Bacillus* sp. 6658, *P. polymyxa* KB, що були селекціоновані раніше за ознакою високої целюлозолітичної активності.

Антифунгальну активність целюлозолітичних бактерій визначали методом зустрічних культур на поживному середовищі МПА + СА [Єгоров Н.С., 1957]. Як тест-культури брали фітопатогенні мікроміцети *F. culmorum* Sacc. 50716, *A. alternate* (Fries) Keissl. 2857, *N. oryzae* Berk. 3000 та *N. oryzae* Berk. 5000 з колекції відділу фізіології і систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і віросології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Як контрольне використовували середовище без посіву целюлозолітичних бактерій. Діаметр колонії вимірювали на 14-ту добу. Відсоток інгібування росту колоній гриба визначали за формулою [13]:

$$\text{Відсоток інгібування росту} = \frac{D_k - D_d}{D_k} \cdot 100\%,$$

де D_k , D_d — діаметр колонії гриба відповідно в контролі та досліді, мм.

Результати досліджень. Під час вивчення взаємодії асоціативних мікроорганізмів з рослиною Нільсену і Соренсену [14] вдалося виділити ізоляти бацил, що мають антагоністичну активність до широкого кола фітопатогенів, у тому числі *Aphanomyces cochleoides*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*. Відібрані штами ідентифікували як *B. polymyxa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. Усі вони продукували і виділяли в зовнішнє середовище гідролітичні ферменти, що руйнують стінки фітопатогенних грибів (cell-wall-grading enzymes). Штам *B. polymyxa* був здатний синтезувати екзохітиназу і ацетил глюкозаміназу, що руйнують багаті хітином і ксиланом клітинні стінки *R. solani*. Бактерії *Bacillus* sp. також придушували життєздатність цього фітопатогена, однак для них була характерна ендохітиназна активність. Бактерії *Bacillus* sp., *Bacillus pumilus* виявили здатність продукувати целюлази і геміцелюлози, які брали участь у деградації клітинних стінок *A. cochleoides*, *P. ultimum*, що містять целюлозу, алактоманазу і монопротеїни. Штами *B. polymyxa* і *B. pumilus* демонстрували антагонізм щодо *A. cochleoides* на чотирьох різних середовищах. Це проявлялося в постійному продукуванні гідролітичних ферментів (*B. polymyxa*) або в індукції запасу ферментів, які «підміняють» один одного в різних середовищах (*B. pumilus*). Таким чином, незважаючи на різні стратегії під

час синтезу ферментів, бацити демонстрували множинний антагонізм щодо фітопатогенних грибів. Зарубіжні дослідники [15] виявили ген *Egl a*, що кодує ендоглюканазу ендоефітів цитрусових *Bacillus pumilus*. Продукт гена, білок, гідролізував целюлозу *in vitro*. Ендоглюканазу проявляли активність за pH = 5,0–8,6 і t = 25–60 °C. Після інкубації в заданих умовах зберігалося 85% активності.

Дослідження антагоністичної активності целюлозолітичних бактерій *Bacillus* sp. 6488, *Bacillus* sp. 6605, *Microbacterium* sp. 6633, *Microbacterium* sp. 6634, *Pseudomonas* sp. 6650, *Bacillus* sp. 6658, *P. polymyxa* KB щодо тест-культур фітопатогенних мікроміцетів *F. culmorum* Sacc. 50716, *A. alternate* (Fries) Keissl. 2857, *N. oryzae* Berk. 3000 та *N. oryzae* Berk. 5000 засвідчили, що ці мікроорганізми пригнічують розвиток *F. culmorum* 50716 — збудника фузаріозу початків кукурудзи, а також мітоспорових грибів *A. alternate* 2857, *N. oryzae* 3000 та *N. oryzae* 5000, які є збудниками нігроспорозу (див. табл., рис. 1).

Найвищий рівень пригнічення росту мікроміцетів характерний для бактерій *Bacillus* sp. 6658. Зона лізису міцелію *F. culmorum*, *N. oryzae* 3000 та *N. oryzae* 5000 становила 1,2 ± 0,2 см, 1,4 ± 0,1 см та 1,7 ± 0,1 см відповідно. Цей мікроорганізм повністю пригнічував розвиток фітопатогенного мікроміцета *A. alternate*.

Бактерії роду *P. polymyxa* KB здатні пригнічувати ріст багатьох грибів-фітопатогенів, що спричиняють захворювання різних культур, за рахунок конкуренції за субстрат, синтезу антибіотичних та інших

Антифунгальна активність целюлозолітичних бактерій щодо фітопатогенних мікроміцетів (зона пригнічення росту)

Бактерія	Зона пригнічення росту тест-культури, мм			
	<i>F. culmorum</i> 50716	<i>A. alternate</i> 2857	<i>N. oryzae</i> 3000	<i>N. oryzae</i> 5000
<i>Bacillus</i> sp.6488	7–10	14–18	2	8–10
<i>Bacillus</i> sp. 6605	7–10	14–18	2	8–10
<i>Microbacterium</i> sp. 6633	3–5	5–8	3–4	3–7
<i>Microbacterium</i> sp. 6634	3–5	2–5	3–4	3–7
<i>Pseudomonas</i> sp. 6650	3–5	2–5	3–4	3–7
<i>Bacillus</i> sp. 6658	10–15	20–24	11–16	16–19

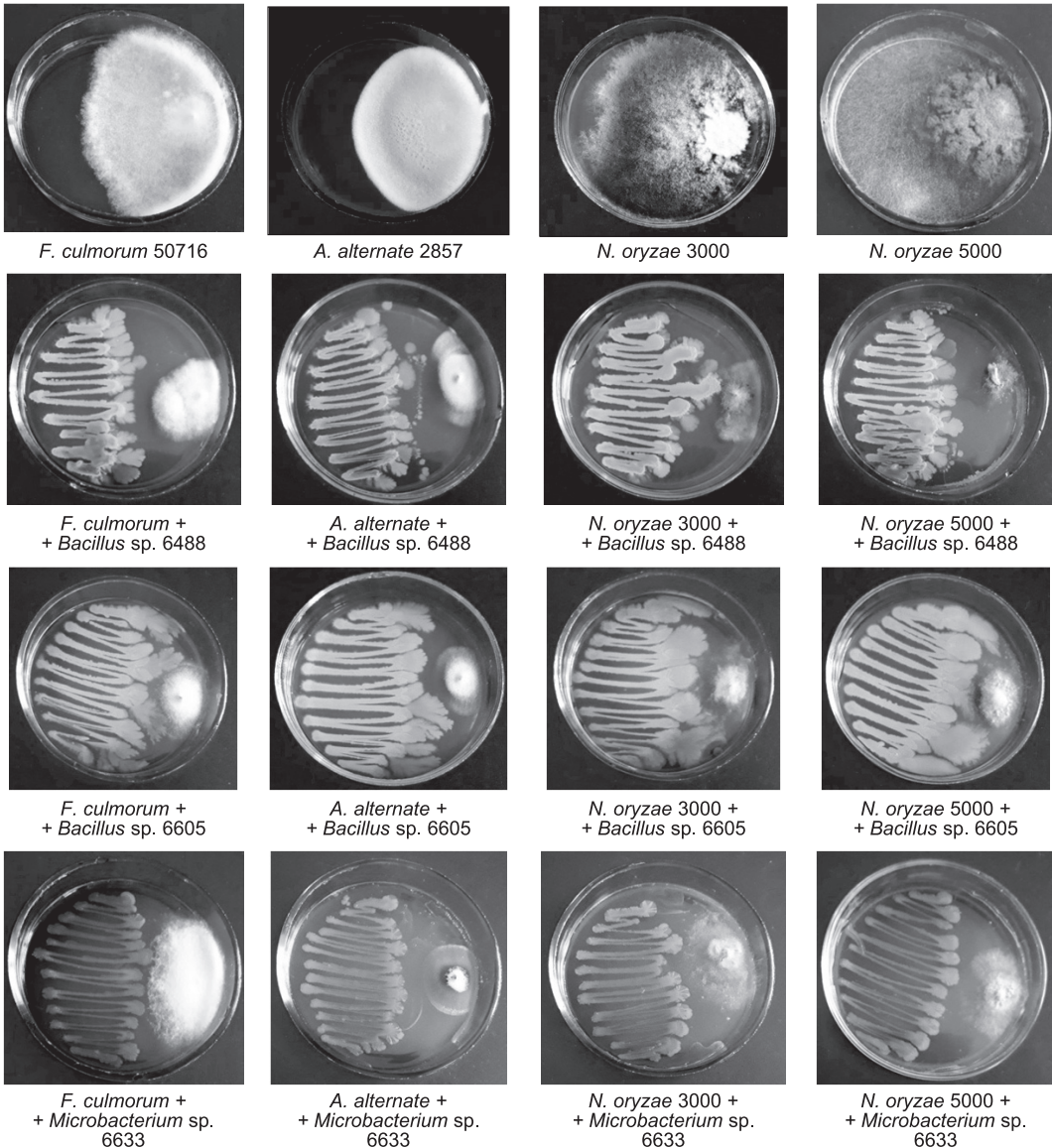


Рис. 1 (початок). Антифунгальна активність бактерій *Bacillus* sp. 6488, *Bacillus* sp. 6605, *Microbacterium* sp. 6633, *Microbacterium* sp. 6634, *Pseudomonas* sp. 6650, *Bacillus* sp. 6658, *P. polytuxa* KB щодо фітопатогенних мікроміцетів *F. culmorum*, *A. alternate*, *N. oryzae* 3000 та *N. oryzae* 5000

антифунгальних сполук, гідролітичних ферментів [16].

Дослідження антагоністичної активності *P. polytuxa* KB щодо тест-культур фітопатогенних мікроміцетів *F. culmorum* 50716, *A. alternate*, *N. oryzae* 3000 та *N. oryzae* 5000 свідчать, що цей штам практично повністю

пригнічує розвиток *F. culmorum* 50716 — збудника фузаріозу початків кукурудзи, мітоспорових грибів *A. alternate* 2857, *N. oryzae* 3000 та *N. oryzae* 5000 (див. рис. 1), які є збудниками нігроспорозу. За одночасного посіву *P. polytuxa* KB і фітопатогенних мікроміцетів на поживне середовище (МПА + СА)

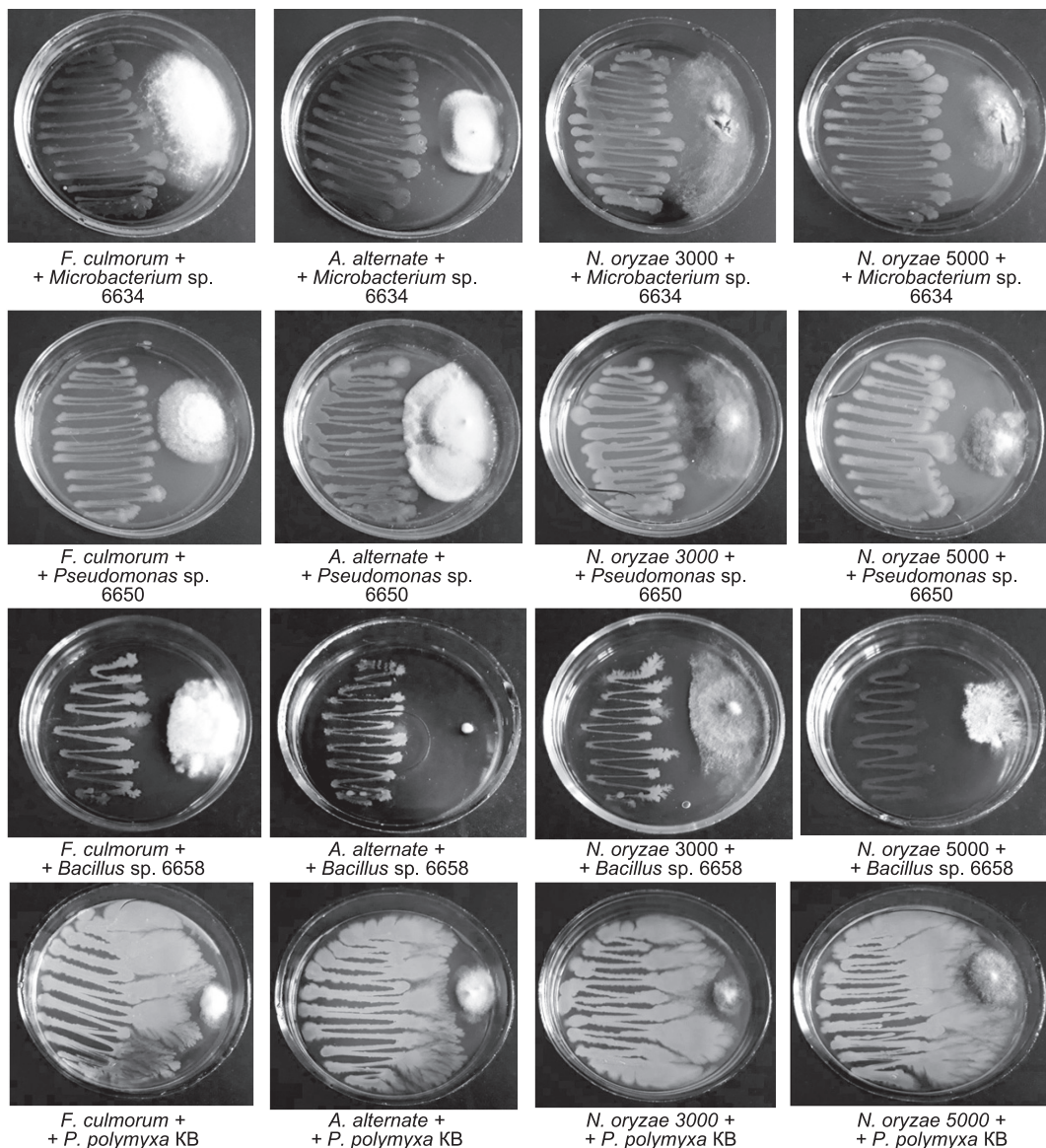


Рис. 1 (закінчення)

спостерігається витіснення мікроміцетів бактеріями, що є свідченням антифунгальної активності цих бактерій. Як впливає з даних рис. 2, бактерії *P. polymyxa* KB інгібували ріст *F. culmorum* 50716 на 82,4%, *A. alternata* 2857 — на 67,0%, *N. oryzae* 3000 — на 81,6%, а *N. oryzae* 5000 — на 77,6%.

Бактерії родів *Bacillus* і *P. polymyxa* мають високу швидкість росту, стрімко заселяють

субстрат та інтенсивніше використовують поживні речовини. Внаслідок цього мікроміцети втрачають можливість розвиватись і поступово витісняються з субстрату. Спостереження дають підставу припустити, що механізм виявленої антагоністичної активності полягає в конкуренції за поживний субстрат. Відомо [Попкова К.В., 2005], що в природних умовах антагонізм такого типу

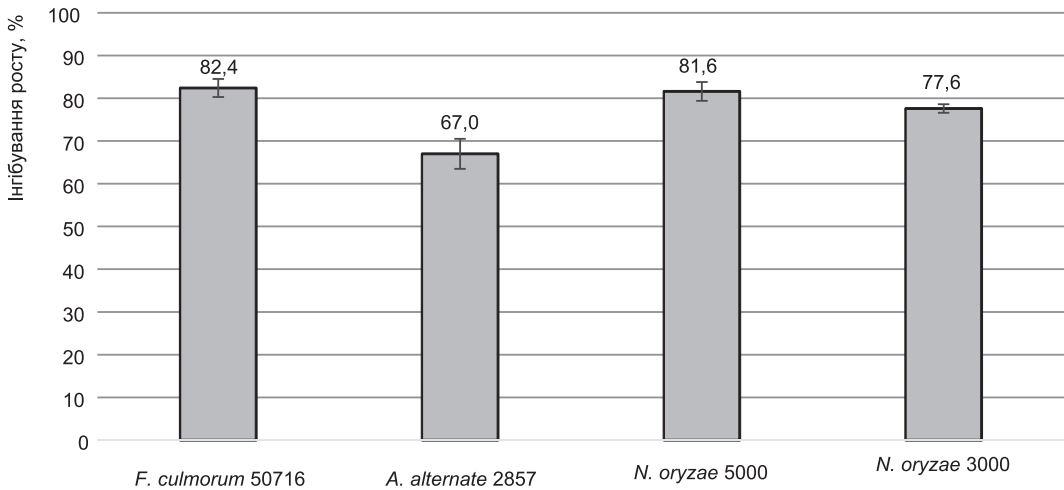


Рис. 2. Пригнічення росту фітопатогенних грибів *P. політруха* КВ

спостерігається найчастіше у ґрунті, в ризосфері, де мікроорганізми конкурують за джерела живлення.

Отже, бактерії *Bacillus* sp. 6658 та *P. політруха* КВ мають високу антифунгальну

активність щодо фітопатогенних мікроміцетів, розвиток яких вони гальмують за рахунок конкуренції за місця заселення і поживні речовини, необхідні для розвитку фітопатогенів.

Висновки

Активні штами целюлозолітичних бактерій родів *Bacillus* sp. 6658 та *P. політруха* КВ проявляють високу антифунгальну активність щодо фітопатогенних мікроміцетів *F. culmorum* Sacc. 50716, *A. alternate* (Fries) Keissl. 2857, *N. oryzae* Berk. 3000 та *N. oryzae* Berk. 5000. За впливу *Bacillus* sp. 6658 зона лізису міцелію *F. culmorum*, *N. oryzae* 3000 та *N. oryzae* 5000 становила $1,2 \pm 0,2$ см, $1,4 \pm 0,1$ см та $1,7 \pm 0,1$ см відповідно. Бактерії повністю пригнічу-

вали ріст фітопатогенного мікроміцету *A. alternate*. Бактерії *P. політруха* КВ інгібували ріст *F. culmorum* 50716 на 82,4%, *A. alternate* 2857 — на 67,0%, *N. oryzae* 3000 — на 81,6%, *N. oryzae* 5000 — на 77,6%. Отже, мікроорганізми *Bacillus* sp. 6658 та *P. політруха* КВ є перспективними для розроблення мікробного препарату — біодеструктора, призначеного для оптимізації мінералізації-імобілізації за використання побічної продукції рослинництва.

Tokmakova L.¹, Shevchenko L.²

Institute of agricultural microbiology and agro-industrial production of NAAS, 97 Shevchenko Str., Chernihiv, 14027, Ukraine; email: ¹tokmakova_ln@ukr.net, ²shevchenkolyubov@ukr.net; ORCID: ¹0000-0001-5501-2058, ²0000-0002-2637-1999

Antagonistic activity of cellulolytic bacteria — destroyers of organic matter against phytopathogenic micromycetes

Goal. To investigate the ability of active strains of cellulolytic bacteria to exhibit antagonistic activity against phytopathogenic micromycetes. **Methods.** To determine the antifungal activity of bacteria, the microbiological method of counter-cultures on

a nutrient medium was used. **Results.** The ability of active strains of cellulolytic bacteria *Bacillus* sp. 6488, *Bacillus* sp. 6605, *Microbacterium* sp. 6633, *Microbacterium* sp. 6634, *Pseudomonas* sp. 6650, *Bacillus* sp. 6658, *Paenibacillus polymyxa* KB to show antagonistic activity against the test cultures of phytopathogenic micromycetes *Fusarium culmorum* Sacc. 50716, *Alternaria alternate* (Fries) Keissl. 2857, *Nigrospora oryzae* Berk. 3000 and *Nigrospora oryzae* Berk. 5000 (from the collection of the Department of Physiology and Systematics of Micromycetes of the D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine). It was established that active strains of cellulolytic

bacteria suppress the development of *F. sulmorum* 50716, the causative agent of fusarial kernel rot of corn, as well as mitosporous fungi *A. alternate* 2857, *N. oryzae* 3000, and *N. oryzae* 5000, which are causative agents of nigrosporiasis. The highest level of micromycete growth inhibition is characteristic for *Bacillus* sp.6658. The zone of mycelium lysis of *F. sulmorum*, *N. oryzae* 3000 and *N. oryzae* 5000 was 1.2 ± 0.2 cm, 1.4 ± 0.1 cm, and 1.7 ± 0.1 cm, respectively. Bacteria *Bacillus* sp. 6658 completely suppressed the growth of the phytopathogenic micromycete *A. alternate*, the bacterium *P. polymyxa* KB — the development of *F. sulmorum* 50716 and mitosporous fungi. *A. alternate* 2857, *N. oryzae* 3000 and *N. oryzae* 5000, *P. polymyxa* KB inhibited the growth

of *F. sulmorum* 50716 by 82.4%, *A. alternate* 2857 — by 67.0%, *N. oryzae* 3000 — by 81, 6%, and *N. oryzae* 5000 — by 77.6%. **Conclusions.** Cellulolytic bacteria *Bacillus* sp. 6658 and *P. polymyxa* KB can show high antifungal activity against phytopathogenic micromycetes *F. culmorum* Sacc. 50716, *A. alternate* (Fries) Keissl. 2857, *N. oryzae* Berk. 3000, and *N. oryzae* Berk. 5000. These microorganisms are promising for the development of a microbial preparation — a bio-destroyer designed to optimize mineralization and immobilization using by-products of crop production.

Key words: antagonism, antagonistic bacteria, micromycetes, phytopathogens, cellulose-destroying bacteria.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202306-02>

Бібліографія

1. Сайко В.Ф. Використання на удобрення побічної продукції рослинництва. Зб. наук. пр. Ін-ту землеробства. 2003. Спецвипуск. С. 3–9.
2. Спосіб підвищення урожайності кукурудзи на зерно за використання деструкції солом: пат. 144123 Україна: А01С 21/00. № у 2019 12115; заявл. 21.12.2019; опубл. 10.09.2020. 8 с.
3. Jacinthe P.A., Lal R., Kimble J.M. Effects of Wheat Residue Fertilization on Accumulation and Biochemical Attributes of Organic Carbon in a Central Ohio Luvisol. *Soil Scienc.* 2002. V. 167. Is. 11. P. 750–758.
4. Центило Л.В., Сендецький В.М. Біологічна ефективність використання біодеструкторів. Вісник Житомирського національного аграрного університету. Агроекологія. 2014. № 2 (42). Т.1. С. 93–99.
5. Штам *Bacillus subtilis* — продуцент комплексу ферментів з целюлозолітичною активністю: пат. 102308 Україна: С12N 1/00. № у 201503800; заявл. 22.04.2015; опубл. 26.10.2015. 8 с.
6. Штам гриба *Trichoderma viride* з високою целюлозолітичною активністю: пат. 121555 Україна: С12N 1/14 С12N 9/42. № у 201705934; заявл. 14.06.2017; опубл. 11.12.2017. 7 с.
7. Йовенко А.С. Целюлозолітична активність гриба-антагоніста *Chaetomium cochliodes*, біо-агента мікробного препарату Хетоміка. Сільськогосподарська мікробіологія. 2016. Вип. 24. С. 18–23.
8. Дімова С.Б., Деркач С.М., Волкогон В.В. Активність ферментного целюлозолітичного комплексу та антагоністичні властивості *Trichoderma harzianum* 128. Сільськогосподарська мікробіологія. 2021. Вип. 33. С. 13–24. doi: <https://doi.org/10.35868/1997-3004.33.13-24>
9. Jacinthe P.A., Lal R., Kimble J.M. Effects of

Wheat Residue Fertilization on Accumulation and Biochemical Attributes of Organic Carbon in A Central Ohio Luvisol. *Soil Scienc.* 2002. V. 167. Is. 11. P. 750–758.

10. Патица В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В. та ін. Біологічний азот; за ред. В.П. Патики. Київ: Світ, 2003. 422 с.

11. Vaubekova D.G. Roststimuliruyuschaya aktivnost mikroorganizmov roda Bacillus. *Universum: Himiya i biologiya: elektron. nauchn. zhurn.* 2014. N 7.

12. Павленко А.А., Копилов Є.П., Цехмістер Г.В. Ефективність застосування штаму *Trichoderma viride* з високою антагоністичною та целюлозолітичною активністю. Сільськогосподарська мікробіологія. 2021. Вип. 33. С. 88–95. doi: <https://doi.org/10.35868/1997-3004.33.88-95>

13. Song J., Soyong K., Kanokmedhakul S. Antifungal activity of *Chaetomium elatum* against *Pyricularia oryzae* Causing Rice Blast. *International Journal of Agricultural Technology.* 2016. V. 12 (7.1). P. 1437–1447.

14. Nielsen M.N., Sorensen J., Fels j., Pedersen H.C. Secondary metabolite and endochitinase — dependent antagonism toward plant — pathogenic microfungi of pseudomonas fluorescens isolates from sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. V. 64. P. 3563–3569.

15. Lima A.C.F., Junior J.M.-P., Macari M., Malheiros E.B. Efeito do uso de probiotico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. *R. Bras. Zootec.* 2003. V. 32. P. 200–207.

16. He Z.G., Kislá D., Zhang L.W. et al. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. *Applied and Environmental Microbiology.* 2007. V. 73. P. 168–178.