

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
Біологічний факультет
Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

**Дипломна робота
бакалавра**

**на тему: «Біотехнологія препаратів для біозахисту рослин на основі
морських спороутворюючих бактерій»**

Biotechnology of preparations for plant bioprotection based on marine spore-forming bacteria

Виконала: студентка IV курсу
денної форми навчання
спеціальність 162 Біотехнології та
біоінженерія
Кружиліна Валерія Володимирівна

Науковий керівник
кандидат біологічних наук, доцент
Зінченко Оксана Юріївна

Рецензент:
кандидат біологічних наук, доцент
Якуба Ірина Петрівна

Рекомендовано до захисту:
Протокол засідання кафедри

№ ____ від _____. 2023 р.

Завідувач(ка) кафедри

(підпис) **Філіпова Т. О.**
(прізвище, ім'я)

Захищено на засіданні ЕК № _____
протокол № __ від _____. 2023 р.
Оцінка _____/_____/_____
(за національною шкалою/шкалою ECTS/ бали)

Голова ЕК

(підпис) **Ямборко Г.В.**
(прізвище, ім'я)

Одеса 2023

АНОТАЦІЯ

Роботу виконано на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І. І. Мечникова. Досліджено здатність до біосинтезу вторинних метаболітів для біозахисту сільськогосподарських культур споротвірних бактерій, виділених з Чорного моря. З використанням методів біоінформатичного аналізу у досліджених мікроорганізмів було виявлено 5 типів вторинних метаболітів, активних щодо збудників інфекцій рослин. Найбільшу кількість таких сполук виявлено у представників видів *Bacillus subtilis* та *Bacillus amyloliquefaciens*. Було запропоновано технологічну схему виробництва препарату на основі цих видів для біологічного захисту сільськогосподарських культур.

Дипломну роботу викладено на 34 сторінках, вона містить 5 таблиць та 1 рисунок. Наведено посилання на 30 джерел літератури (1 кирилицею та 29 латиницею).

Ключові слова: споротвірні бактерії, бази даних, біологічний захист рослин.

The work was carried out at the Department of Microbiology, Virology, and Biotechnology of Odessa I.I. Mechnikov National University. The ability of spore-forming bacteria of the genus *Bacillus* isolated from the Black Sea to synthesize secondary metabolites for biological protection of agricultural plants was studied. Using bioinformatics analysis methods, five types of secondary metabolites with the inhibitory activity towards causative agents of infections of plants were identified in the studied bacteria. The highest number of such compounds was revealed in the representatives of species *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. A technological scheme for the production of preparation for plant bioprotection based on these species was proposed.

The thesis consists of 34 pages, it contains 5 tables, and 1 figure. References to 30 sources of literature (1 in Cyrillic and 29 in Latin) are given.

Keywords: spore-forming bacteria, antiSMASH, biostimulants, surfactin, nitrogen fixation.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Загальна характеристика роду <i>Bacillus</i> та систематичне положення.....	7
1.2. Вплив спороутворюючих бактерій на ріст рослин.....	9
1.3. Участь споротвірних бактерій в адаптації рослин до абіотичних стресових факторів середовища.....	11
1.4. Захисна дія споротвірних бактерій на рослини.....	15
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	18
2.1. Місце та матеріали дослідження.....	18
2.2. Прогнозування спектру ріст-стимулюючих сполук досліджуваних мікроорганізмів.....	21
2.3. Технологічна схема отримання препарату для біоре mediaції ґрунтів на основі актинобактерій.....	21
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	24
ВИСНОВКИ.....	30
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	31

ПЕРЕЛІК ТЕРМІНІВ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

АБК – абсцизова кислота

АЦК – 1-аміноциклопропан-1-карбонова кислота

АФК – активні форми кисню

ВМ – важкі метали

ІОК – індоліл-3-оцтова кислота

ЛОС – летючі органічні сполуки

ХЗЗР – хімічні засоби захисту рослин

ISR – induced systemic resistance

PGPB – plant-growth promoting bacteria

PGPR – полігліцерил полирицинолеат

ВСТУП

Рослини повсякчас піддаються впливу стресових факторів – біотичних та абіотичних. У такій ситуації питання підвищення стійкості рослин до патогенів, набуває особливого значення. Для вирішення цієї проблеми необхідне детальне вивчення фізіологічних особливостей макроорганізму-господаря та патогенного агента, а також механізмів їх взаємодії, що в результаті дозволить створити ефективну систему захисту рослин. Сучасні технології обробки сільськогосподарських рослин передбачають методи використання хімічних агентів, що забезпечують захист від хвороб, до яких відносяться, наприклад, протруювання насіння і обприскування посівів пестицидами. Однак такий шлях боротьби з захворюваннями є екологічно небезпечним, тому потрібне подальше вдосконалення наявних хімічних засобів захисту рослин (ХЗЗР) і створення безпечніших та дружніх до природи засобів боротьби з захворюваннями [Пилипенко та ін, 2015].

Наразі у світі спостерігається тенденція до скорочення доз агрохімікатів, що зумовлює зростання потреби у нових, додаткових джерелах мінерального живлення та біологічних засобах захисту рослин. У останні роки увагу дослідників все більше привертає створення біопрепаратів на основі бактерій, здатних захищати рослини від патогенів та стимулювати їх ріст.

Сприятливий вплив мікроорганізмів на рослини відомий давно, що призвело до впровадження технологій промислового виробництва мікробних препаратів для рослинництва. Це частково дозволило знизити рівень застосування агрохімікатів, але проблема ще далека від свого вирішення. Одними з перших як основа препаратів для біологічного контролю патогенів сільськогосподарських культур успішно застосовувалися бактерії роду *Bacillus*. Ці мікроорганізми вважаються одними з найперспективніших об'єктів біотехнології через їхній космополітизм (поширення бацил в ґрунті, воді, на поверхні і у внутрішніх тканинах рослин), активний метаболізм та здатність до продукування біологічно активних метаболітів широкого спектру

дії, висока адаптивність до несприятливих умов навколишнього середовища [Arnesen et al., 2008].

Останнім часом увага дослідників прикута до споротвірних бактерій з мало досліджених екосистем, зокрема, з морського середовища.

У зв'язку з цим **метою** роботи була розробка біотехнології отримання препаратів для біозахисту рослин на основі споротвірних бактерій, виділених з Чорного моря.

У відповідності до поставленої мети було поставлено наступні завдання:

1. Проаналізувати видовий склад спороутворюючих бактерій, виділених з Чорного моря, що наявні у колекції морських мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології.
2. Знайти геноми відповідних видів мікроорганізмів у GenBank та проаналізувати їх на наявність біосинтетичних кластерів, відповідальних за синтез вторинних метаболітів з активністю щодо збудників захворювань рослин, за допомогою баз даних AntiSMASH та CAMPR3.
3. Здійснити інформаційний пошук щодо спектру патогенів сільськогосподарських рослин та механізму дії виявлених вторинних метаболітів на їх клітини.
4. Розробити технологічну схему отримання препарату для біозахисту рослин на основі найактивнішого потенційного продуцента факторів антагонізму серед досліджених морських спороутворюючих бактерій.

Об'єкт дослідження – біотехнологія мікробних препаратів для біологічного захисту сільськогосподарських рослин.

Предмет дослідження – дослідження можливості використання споротвірних бактерій Чорного моря для створення засобів біозахисту.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика роду *Bacillus* та систематичне положення

Рід *Bacillus* (родина *Bacillaceae*) являє собою різноманітну групу, представники якої повсюдно поширені в природі. Рід був виділений Ф. Коном в 1872 році, а вид *B. subtilis* був визначений як типовий вид М. Соулом в 1932 році. Разом з *B. subtilis* були описані інші споріднені види (*B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. axarquiensis*, *B. licheniformis*, *B. malacitensis*, *B. mojavensis*, *B. sonorensis*, *B. tequilensis*, *B. vallismortis*, *B. velezensis*) [Biesta-Peters et al, 2016].

Незважаючи на морфологічні та фізіолого-біохімічні відмінності між видами бактерії роду *Bacillus* мають ряд спільних важливих властивостей (здатні до синтезу численних метаболітів з широким спектром біологічної активності, легко адаптуються до різних умов навколишнього середовища, є широко розповсюдженими у різних біотопах), завдяки яким вони, зокрема, здатні захищати рослини від патогенів і дії інших стресових факторів навколишнього середовища.

Бактерії роду *Bacillus* прийнято відносити до типових ґрунтових бактерій, однак у численних дослідження є свідчення їх повсюдного поширення: бацили знайдені в ґрунті, воді, на поверхні і у внутрішніх тканинах рослин [Fan et al, 2017].

Особливий інтерес викликають ендоефітні представники роду та споріднених родів. Вони здатні колонізувати тканини всередині рослини, при цьому не викликаючи захворювань і не спричиняючи негативного впливу на розвиток рослинного організму.

Ендоефітні *Bacillus* spp. вважаються перспективними агентами біологічного контролю в силу займаної ними природної екологічної ніші, оскільки здатні заселяти те ж саме середовище разом з фітопатогенами багатьох видів та конкурувати з ними за місце мешкання та джерела живлення. Ендоефіти синтезують велику кількість біологічно активних метаболітів та за рахунок цього виконують безліч корисних функцій для рослини-господаря.

Існує думка, що ендوفіти в процесі еволюції з'явилися як проміжна група між сапрофітами та фітопатогенами, і що кожен з 300000 видів існуючих в світі рослин є господарем одного або декількох видів ендوفітів. Проте, на сьогодні видовий склад ендوفітів добре вивчений у обмеженого кола видів рослин: цитрусових, цукрової тростини, кукурудзи, евкаліпту, полуниці, цукрового буряка, картоплі і деяких інших [Mossel et al., 1953; Pérez-García et al., 2011].

Зазвичай одна рослина колонізується декількома видами грампозитивних і грамнегативних бактерій-представників різних родів, зокрема, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Kocuria*, *Lysinibacillus*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Rhodanobacter*, *Stenotrophomonas*. Однак переважна кількість видів ендوفітних представлена видами родів *Streptomyces* і *Bacillus*.

Ендوفіти *Bacillus* spp. знайдені у внутрішніх тканинах окремих частин рослин: насіння, фруктів, стебел, листя, коренів і бульб, квіток. Зокрема, *B. amyloliquefaciens* CC09 виділені з здорових тканин камфорного дерева (*Cinnamomum camphora*), лікарської рослини *Scutellaria baicalensis* Georgi; *B. subtilis* EDR4 – з фільтрату коренів пшениці, *B. subtilis* ZZ120 – з стебел *Prunus mume* (родина: розоцвітих); *B. licheniformis* і *B. pumilus* – з коренів ширококільчика квіткового (*Platycodon grandiflorum*); представники *B. subtilis*, *B. thuringiensis* і *B. pumilus* – з бульбочок сої і з тканин пшениці; *B. subtilis*, *B. pumilus* і *Bacillus* sp. – з кукурудзи; *B. endophyticus* і *Bacillus* sp. – бавовника. Різні види ендوفітів, в тому числі і представники роду *Bacillus*, виділені з коренів і стебел рису [Sandra et al, 2012].

Ендوفітні бактерії можуть колонізувати будь-яку внутрішню частину рослини, однак найвища щільність популяції ендوفітів спостерігається в коренях, і спостерігається поступове зменшення концентрації клітин від тканин коренів до листя та інших надземних органів.

1.2. Вплив спороутворюючих бактерій на ріст рослин

Здатність бактерій роду *Bacillus* стимулювати ріст і розвиток різних рослин широко вивчена, як в природних, так і лабораторних умовах. Так, відомо, що штам *B. subtilis* NRRL B-30408 стимулював ріст та підвищував врожайність рису (*Oryza sativa*), дагусси (*Eleusine coracana*), пайзе (*Echinochloa frumentacea*). Застосування для обробки рослини каланхое штамів *B. amyloliquefaciens* IN937a, *B. cereus* BS107, *B. pumilus* INR7, *B. subtilis* GB03 стимулювало не лише ріст, а й безстатеве розмноження. Культура *B. subtilis* BS87 пришвидшувала ріст пагонів, накопичення біомаси, кількості листя, спостерігалось підвищення вмісту флавоноїдів, стероїдів та ефірної олії у лікарських рослин роду *Anoectochilus* (*A. formosanus*, *A. roxburghii*). Бактерії *B. velezensis* BaCO3 посилювали ріст різних видів сільськогосподарських рослин. Представники *Bacillus* spp. (*B. fortis* IAGS162, *B. subtilis* IAGS174 та інші) стимулювали зростання томатів. Штам *B. subtilis* A1 активізував ріст рослин перцю і сприяв збільшенню кількості і маси плодів [Shafi et al., 2017].

Відомо, що багато видів роду *Bacillus*, зокрема, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* демонструють позитивний вплив на рослини ріпаку, пшениці, томату, кукурудзи, головним чином, завдяки антагоністичним властивостям щодо фітопатогенних мікроорганізмів.

Крім того, окремі види роду *Bacillus* здатні до синтезу таких стимуляторів росту як ауксини, цитокініни і гіберелліни. Деякі види споротвірних бактерій можуть також синтезувати в певній концентрації і інгібітори – етилен і абсцизову кислоту (АБК) [Solanki et al., 2012].

При культивуванні багатьох штамів *Bacillus* spp. виявлено здатність до синтезу ауксину – індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК).

Одним з основних біологічних ефектів бактеріальної ІОК є покращення розгалуженості коренів рослин, що сприяє покращенню їх мінерального живлення. ІОК мікроорганізмів також може запобігати згубному впливу стресових факторів середовища. Наприклад, ІОК стимулювала ріст проростків пшениці після обробки культурами бацил, у рослин люцерни підвищувалася

стійкість до сольового стресу при обробці їх бактеріями *S. meliloti* DR-64, що автори пояснюють накопиченням проліну та підвищенням рівня ферментів антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази, пероксидази, глутатіонредуктази, аскорбатпероксидази порівняно з необробленими рослинами. У деяких видів роду *Bacillus* виявлена здатність до синтезу гіберелінів і цитокінінів. Синтез бактеріальних цитокінінів продемонстрований у *B. subtilis* і *B. licheniformis* [Tsotetsi et al., 2022].

Синтез гіберелінів підтверджений у *B. pumilus* і *B. licheniformis*, у ендofітних штамів *B. subtilis*, виділених з рослин борщівника, листя еритрини, а також у *B. cereus*, ізольованих з листя гевеї.

Крім гормонів-стимуляторів росту і розвитку рослин, добре відомі і інгібітори, такі як АБК і етилен. У високих концентраціях етилен діє як гормон стресу і негативно впливає на ріст рослин. Засолення ґрунтів, посуха, заболочування, дія важких металів або патогенів сприяють збільшенню 1-аміноциклопропан-1-карбонової кислоти (АЦК) – попередника етилену. PGPR, і серед них представники роду *Bacillus*, здатні синтезувати фермент АЦК-деаміназу, який знижує рівень етилену в рослинах, в результаті чого поліпшуються їх ріст і розвиток при стресах. Показано, що рівень АБК в рослинах або пагонах арабідопсису можуть знижувати летючі органічні сполуки (ЛОС), що продукуються клітинами *B. subtilis* GB03. Вважається, що зниження рівня АБК дозволяє бактеріям цього штаму стимулювати підвищення фотосинтетичної активності рослини і, таким чином, ріст макроорганізму і покращення середовища власного існування [Xu et al., 2014].

Деякі бактерії можуть синтезувати органічні сполуки: поліаміни (путресцин, спермін, спермідин і кадаверин, що стимулюють ріст рослин, органогенез і ембріогенез, затримують старіння і відіграють захисну роль при абіотичних стресах. У клітинах самих бактерій роль поліамінів зараз обговорюється, передбачається їх участь у стійкості клітин до кислого середовища, осмотичного стресу і в захисті від токсичності активних форм

кисню. У *B. subtilis* поліаміни служать сигнальними молекулами для забезпечення рухливості і формування біоплівки.

PGPB, в тому числі представники видів *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. firmus*, здатні покращувати ріст і розвиток рослин завдяки біосинтезу вітамінів (тіаміну, рибофлавіну, кобаламіну). Вітаміни виконують роль кофакторів у різних метаболічних шляхах, сприяють виробленню ефірних сполук для рослин і бактерій, підвищувати стійкість до патогенів; стимулювати ріст рослин [Zebelo et al., 2016].

Таким чином, споротвірні бактерії, в тому числі ендofітні, здатні до продукування різноманітних фітогормонів і можуть також регулювати їх синтез в рослинах. У літературі є дані щодо специфічності синтезу гормональних речовин при взаємодії окремих видів ендofітів з певними видами рослин і при певних умовах середовища.

За останні роки у зв'язку з розвитком методів геносистематики деякі бактерії роду *Bacillus* були рекласифіковані та отримали нові родові та видові назви. У практичній частині роботи використано сучасні назви таксонів споротвірних бактерій, але слід мати на увазі, що раніше вони належали до роду *Bacillus*, отже, наведені в даному розділі біологічні характеристики є справедливими для них [Zhang et al., 2016].

1.3. Участь споротвірних бактерій в адаптації рослин до абіотичних стресових факторів середовища

Швидкі темпи наростання глобальних змін клімату і діяльності людини, на думку вчених, призведуть до зростання абіотичних стресів. Несприятливі умови середовища (посуха, спека, холод, засоленість ґрунтів, забруднення важкими металами і т.ін.) негативно впливають на розвиток рослинних організмів і є основною причиною втрат врожаю у всьому світі.

Практично всі види абіотичних стресів призводять до оксидантного стресу і запускають генерацію в рослинних клітинах активних форм кисню

(АФК), таких, як супероксид (O_2^-) гідроксильний радикал ($OH^\cdot$), синглетний кисень (1O_2) і перекис водню (H_2O_2) [Yang et al., 2015].

Утворення АФК тягне за собою індукцію перекисного окиснення мембранних ліпідів, білків, інгібування активності ферментів, пошкодження нуклеїнових кислот і подальшу загибель клітин.

У нормі рослини володіють механізмами для зменшення ступеня їх окисного пошкодження за рахунок активації антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза, монодегідроаскорбат редуктаза, дегідроаскорбатредуктаза, глутатіонредуктаза, каталаза, глутатіонпероксидаза) і накопичення неензимних сполук, що ефективно знижують рівень АФК (цистеїн, відновлений глутатіон, каротиноїди, аскорбінова кислота, α -токоферол та інші). Проте, якщо кількість утворених АФК перевищує здатність рослини до їх детоксикації, запускаються дегенеративні реакції, і типовими симптомами цього є втрата осмотичного потенціалу, в'янення і некроз. Отже, баланс між синтезом і інактивацією АФК має вирішальне значення для підтримки активного росту і метаболізму рослин і, в цілому, впливає на їхню стресостійкість [Yang et al., 2015].

Серед абіотичних факторів, що впливають на життєдіяльність рослин, вода є найважливішим. Нестача води може включати в себе посуху та сольовий стрес. Встановлено, що ризобактерії здатні значно підвищувати посухостійкість рослин. Використання рістстимулюючих бактерій для підвищення стійкості рослин до посухи має наступні переваги: невеликі витрати при виділенні, розмноженні і застосуванні PGPR; деякі PGPR можуть бути використані для обробки різних видів рослин; простота обробки великих площ сільськогосподарських культур завдяки обробці насіння і легкості інокуляції.

Внесення в ґрунт рістстимулюючих бактерій під час посухи покращує загальний стан рослин, регулюючи фізіолого-біохімічні показники. Так, інокуляція рослин арабідопсису бактеріями *B. megaterium* BOFC15 сприяла посиленню їх росту під час посухи та збільшенню маси листової пластинки.

Через кілька днів після початку посухи інокульовані рослини демонстрували нижчий рівень синтезу пошкоджуючих факторів (АФК), ніж контрольні. Отже, виживаність їх була значно вищою [Wang et al., 2014].

Активність антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази, пероксидази, каталази і аскорбатпероксидази) була значно вищою у оброблених рослин, ніж у контрольних. В умовах нестачі вологи накопичення АБК у рослин, оброблених бактеріями, було значно вищим, ніж у інтактних, що супроводжувалося значним зниженням швидкості втрати вологи листям оброблених рослин.

Відомим механізмом підтримки гомеостазу у рослин в умовах посухи є осморегуляція шляхом накопичення розчинних цукрів (глюкози, сахарози і фруктози), тому їх метаболізм відіграє значну роль у стресостійкості рослинного організму. Zhang зі співавторами [Zhang et al., 2010] показали, що обробка рослин конюшини білої культурою *B. subtilis* GB03 покращувала посухостійкість завдяки накопиченню осмопротекторних сполук.

Обробка трахінії двоколоскової клітинами штаму *B. subtilis* B26 підвищувала активність метилтрансфераз, які беруть участь у регуляції метилювання ДНК клітин рослини. За хронічної посухи рівень метилювання тотальної ДНК у оброблених рослин залишався високим у порівнянні з інтактними. Автори вважають, що *B. subtilis* B26 потенційно може здійснювати епігенетичне регулювання і підвищувати стійкість трахінії до посухи [Zhao et al., 2017].

Показана також роль представників р. *Bacillus* у підвищенні толерантності рослин до сольового стресу. Засоленість ґрунту, за прогнозами вчених, до 2050 року торкнеться більше 50% всіх орних земель. Мінералізація ґрунту тягне за собою осмотичний стрес, дефіцит води, закриття продихів, а також дефіцит необхідних поживних речовин, зокрема, іонів K^+ . Одночасно, збільшення концентрації іонів Na^+ всередині рослини знижує швидкість фотосинтезу і накопичення біомаси. Встановлено, що окремі PGPB (представники родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Burkholderia*, *Rhizobium*

та ін.) при засоленні ґрунту підвищують толерантність рослин гороху, кукурудзи, пшениці, винограду, квасолі, рису до стресу.

Показано, що культура *B. subtilis* стимулювала ріст рослин томату і покращувала стійкість до токсичного впливу йонів NaCl. Zhang з співавторами [Zhang et al., 2010] встановили, що при засоленні ґрунту штам *B. subtilis* N111 ефективно попереджав в'янення бананів. Бактерії штаму *B. subtilis* GB03, виділяючи комплексну суміш ЛОС, посилювали ріст і стійкість до засолення у арабідопсису. Ідентифіковано понад 25 летких речовин, які викликали експресію приблизно 600 генів арабідопсису, відповідальних за зміни у структурі клітинної стінки, первинному та вторинному метаболізмі, з реакціями на стрес, гормональною регуляцією. Клітини цього штаму регулювали гомеостаз, посилювали процеси фотосинтезу, підвищували солестійкість, а також зменшував загальний вміст Na^+ , регулюючи тканиноспецифічну експресію гену AtHKT1.

Наступним несприятливим чинником зовнішнього середовища є забруднення ґрунтів важкими металами (ВМ), яке вже стало глобально звичним явищем через інтенсифікацію антропогенного впливу. У рослин, що ростуть на таких ґрунтах, знижуються показники росту і врожайності. Деякі ВМ, такі як Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, V і Zn потрібні організмам в незначних кількостях, але надмірна кількість цих елементів може їм шкодити. Інші ВМ, такі як Pb, Cd, Hg, а також миш'як, розглядаються як основні загрози, оскільки не виявляють корисних властивостей для організму [Shen et al., 2023].

Крім нівелювання токсичної дії ВМ та стимуляції росту рослин, деякі PGPB можуть функціонувати як мікробні ремедіатори шляхом впливу на біологічну доступність токсикантів завдяки синтезу хелатів.

Описана пряма мікробна біосорбція важких металів (негативно зарядженою поверхнею) і біоакумулюючий ефект речовин, що виділяються мікробною клітиною, що також сприяє зменшенню поглинання токсичних металів рослинним організмом, і є основою мікробної фіторемердіації ґрунтів.

Проведені рядом авторів дослідження показали, що бактерії акумулюють метали на ранній стадії росту. Так, клітини ризосферної культури *Bacillus* sp. 14 здатні поглинати кадмій протягом лаг-фази і до ранньої експоненціальної фази росту, потім метал мігрує на поверхню клітин. У ризобактерій *Bacillus* sp. 13 та *B. thuringiensis* значна кількість кадмію також надходила в клітини з початку культивування до ранньої логарифмічної фази.

Численні дослідження впливу ендofітних бактерій на ріст рослин при стресах доводять їх захисну дію у несприятливих умовах середовища [Solanki et al., 2015].

1.4. Захисна дія споротвірних бактерій на рослини

Бактерії роду *Bacillus* здатні до синтезу великої кількості різноманітних антимікробних речовин та активно використовуються як агенти біологічної боротьби для захисту рослин від збудників хвороб, а також шкідливих комах. У зв'язку з цим вони розглядаються як перспективна альтернатива хімічним пестицидам [Tsotetsi et al., 2022].

До захисних механізмів рослин проти фітопатогенних грибів можуть бути залучені целюлозолітичні ферменти споротвірних бактерій. Один з таких механізмів може включати запуск захисних реакцій олігомерними вуглеводами, які накопичуються при руйнуванні целюлози, другий – літичне руйнування клітинних стінок таких фітопатогенів, як представники родів *Pythium* і *Phytophthora*.

Відомо, що інший вуглеводний полімер – хітин – є більш поширеним компонентом клітинних стінок як грибів, так і комах. Його гідроліз здійснюється шляхом розрізання β -1,4-N-глікозидних зв'язків ферментами хітиназами. Численні хітинази, що синтезуються видами роду *Bacillus*, можуть пригнічувати ріст і розвиток грибних фітопатогенів і несприятливо впливати на клітини різних органів комах, що можна віднести ще до одного механізму захисної активності ендofітних мікроорганізмів [Xu et al., 2014].

Найефективнішим механізмом біоконтролю збудників хвороб рослин є синтез бактеріями антибіотиків. Показано, що близько 4-5% геному більшості представників р. *Bacillus* відповідають за синтез антибіотиків, число яких перевищує 160.

Пептидні антибіотики (ліпопептиди) є переважаючим класом низькомолекулярних антибіотичних сполук бацил та споріднених родів. Вони мають високу стабільність, стійкі до окиснення, дії пептидаз і протеаз і малочутливі до впливу високих температур і низьких значень рН. Ліпопептиди поділяються на три родини в залежності від їх амінокислотної послідовності: ітурини, фенгіцини і сурфактини [Yang et al., 2015].

Ітурини – велика родина антибіотиків, що включає бацилломіцини D і F, бациллопептин (бацилломицин L), мікосубтилін. Ітурини проявляють сильний антибіотичний ефект, а також помірну активність як поверхнево-активні речовини. Здатність до синтезу ітуринів встановлено у *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* і *B. subtilis*.

Фенгіцини А і В (пліпастатицини) ефективні не лише в біологічній боротьбі з патогенами рослин, але й також з личинками москітів. Вони здатні стимулювати в рослин індуковану системну стійкість (ISR, Induced Systemic Resistance). Крім того, фенгіцини діють як біосурфактанти, можуть інгібувати утворення біоплівки у деяких видів бактерій, викликати деструкцію поліциклічних ароматичних вуглеводнів. Фенгіцини продукуються такими видами, як *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*.

Сурфактини (мілікон А, ліхенізин, есперин, пумілацидин та ін.) проявляють антимікробну, противірусну, антимікоплазмову та протигрибкову активність. Ці ліпопептиди мають амфифільну природу і часто використовуються як антибіотики та біосурфактанти, наприклад, не тільки в біологічній боротьбі з хворобами рослин та шкідниками, а й у видобутку нафти, рекультивациї ґрунтів, забруднених важкими металами.

Для сурфактину та ітурину показано синергетичну дію проти грибового фітопатогену *Colletotrichum gloeosporioides*. Їх сумісна дія також викликає

лізис клітинної стінки патогена *Xanthomonas campestris*. Вважається, що ці ліпopeптиди менш токсичні і найбільш ефективні при контролі над фітопатогенами, ніж агрохімікати [Yang et al., 2015].

До антибіотичних сполук, що продукуються бактеріями р. *Bacillus*, також відносяться канозамін, цвіттерміцин, бацитрацин, граміцидин, курстакін та ін.

Канозамін проявляє високу інгібувальну активність щодо фітопатогенних ооміцетів і помірну активність щодо аскоміцетів та базидіоміцетів, а також деяких бактерій.

Цвіттерміцин А являє собою лінійний амінополіол з широким спектром інгібіторної активності щодо грампозитивних і грамнегативних бактерій, і еукаріотичних організмів, у тому числі ооміцетів, а також посилює активність інсектотоксину *B. thuringiensis*.

Синтез цвіттерміцину у *B. subtilis* не підтверджений. Бацитрацин є поліпептидним антибіотиком і синтезується деякими штамми *B. licheniformis* і *B. subtilis*. Найбільшою антимікробною активністю володіє бацитрацин А.

Курстакіни синтезуються *B. thuringiensis* і не є рибосомальними ліпopeптидами з інсектицидною активністю, але виявляють поверхнево-активні властивості та протигрибну активність.

Мікробні летючі сполуки-альдегіди, кетони, спирти, аліфатичні алкени, органічні кислоти, сульфіді, також можуть «створювати перешкоди» грибковим фітопатогенам в їх рості і розвитку. Серед таких сполук, синтезованих деякими штамми *Bacillus* spp., ідентифіковано аміак, ацетоїн, індол, сірководень та інші, які можуть спричиняти в рослинах синтез захисних фітоалексинів [Poulaki et al., 2023].

Більшість досліджень в даний час спрямовані на виявлення та вивчення антибіотиків, синтезованих *Bacillus* spp., що пригнічують ріст конкретних патогенів. Рідше зустрічаються роботи, в яких досліджено вплив речовин з антибіотичною активністю, що продукуються ендofітами, на іншими живими організмами, зокрема, водоростями.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Місце та матеріали дослідження

Робота виконана на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології та в Біотехнологічному науково-навчальному центрі Одеського національного університету імені І. І. Мечникова у 2023 році.

У роботі було використано 63 штами спороутворюючих бактерій, виділених з гідробіонтів, донних відкладень Чорного моря та стічних вод.

Виділення та ідентифікацію мікроорганізмів здійснено стандартними бактеріологічними методами та за допомогою визначення жирнокислотного спектру співробітниками кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ Штеніковом М.Д. та Сащук О.В. Культури споротвірних бактерій були люб'язно надані ними для дослідження.

Перелік досліджуваних культур наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Видова приналежність та джерело виділення досліджуваних штамів

Джерело виділення	Шифр штаму	Вид
Губки	1	<i>B. atrophaeus</i>
	2	<i>B. atrophaeus</i>
	3	<i>B. atrophaeus</i>
	4	<i>Bacillus subtilis</i>
	5	<i>B. subtilis</i>
	6	<i>B. subtilis</i>
	7	<i>B. subtilis</i>
	8	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	9	<i>Priestia megaterium</i>
	10	<i>Priestia megaterium</i>

Продовження табл. 1		
Мідії	11	<i>B. subtilis</i>
	12	<i>B. subtilis</i>
	13	<i>B. subtilis</i>
	14	<i>B. subtilis</i>
	15	<i>B. subtilis</i>
	16	<i>B. subtilis</i>
	17	<i>Bacillus pumilus</i>
	18	<i>B. atrophaeus</i>
Ґрунт	19	<i>Priestia megaterium</i>
	20	<i>Priestia megaterium</i>
	21	<i>Priestia megaterium</i>
	22	<i>Priestia megaterium</i>
	23	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>
	24	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>
	25	<i>Priestia megaterium</i>
	26	<i>Priestia megaterium</i>
	27	<i>Priestia megaterium</i>
	28	<i>Gottfriedia luciferensis</i>
	29	<i>Gottfriedia luciferensis</i>
	30	<i>Gottfriedia luciferensis</i>
	31	<i>Gottfriedia luciferensis</i>
	32	<i>Gottfriedia luciferensis</i>
	33	<i>Gottfriedia luciferensis</i>
	34	<i>Kocuria rhizophila</i>
	35	<i>Kocuria rhizophila</i>
	36	<i>Bacillus subtilis</i>
Продовження табл. 1		

	37	<i>Bacillus subtilis</i>
	38	<i>Bacillus subtilis</i>
	39	<i>Bacillus subtilis</i>
	40	<i>Bacillus subtilis</i>
	41	<i>Bacillus viscosus</i>
	42	<i>Bacillus viscosus</i>
	43	<i>Bacillus viscosus</i>
	44	<i>Bacillus viscosus</i>
	45	<i>Bacillus viscosus</i>
	46	<i>Bacillus pumilus</i>
	47	<i>Bacillus atrophaeus</i>
	48	<i>Bacillus atrophaeus</i>
	49	<i>Bacillus atrophaeus</i>
	50	<i>Bacillus luciferensis</i>
	51	<i>Bacillus sp.</i>
	52	<i>Bacillus sp.</i>
	53	<i>Brevibacillus centrosporus</i>
	54	<i>Bacillus licheniformis</i>
	55	<i>Brevibacillus reuszeri</i>
Ґрунт	56	<i>Brevibacillus reuszeri</i>
	57	<i>Brevibacillus reuszeri</i>
	58	<i>Brevibacillus reuszeri</i>
	59	<i>Brevibacillus reuszeri</i>
	60	<i>Brevibacillus reuszeri</i>
	61	<i>Brevibacillus reuszeri</i>
	62	<i>Brevibacillus reuszeri</i>
Каналізаційні стоки	63	<i>Bacillus subtilis</i>

2.2. Прогнозування спектру ріст-стимулюючих сполук досліджуваних мікроорганізмів

Для прогнозування спектру вторинних метаболітів, що можуть бути задіяні у біологічному захисті рослин, проводили біоінформатичний аналіз даних за двома базами. На початку дослідження у базі даних NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) було проведено пошук повних сиквенсів геномів видів споротвірних бактерій, які містяться в колекції кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова. Потім за допомогою бази даних CAMPR3 (колекція антимікробних пептидів – <http://www.camp3.bicnirrh.res.in>) проводили бластування використанням фільтра UniProtKB / Swiss-Prot та алгоритму blastp (protein-protein BLAST). Послідовності виділених штамів мікроорганізмів були ідентифіковані та використані для подальшого пошуку.

За допомогою бази вторинних метаболітів AntiSMASH <https://antismash-db.secondarymetabolites.org/> у геномах досліджуваних видів споротвірних бактерій було визначено кластери біосентитичних генів, які потенційно можуть бути залучені до синтезу вторинних метаболітів з пригнічувальною дією щодо збудників інфекцій рослин.

2.3. Технологічна схема отримання препарату для біоремедіації ґрунтів на основі актинобактерій

За результатами проведеного дослідження було розроблено технологічну схему отримання препарату для біологічного захисту сільськогосподарських культур (рис. 1). Для основи препарату були обрані *Bacillus subtilis* та *Bacillus amyloliquefaciens*, у яких було встановлено здатність до вироблення чотирьох біологічно активних вторинних метаболітів, активних щодо 7 збудників захворювань рослин (переважно бактеріальних).

Для культивування пропонується використовувати середовище на основі меляси (15 г/л), кукурудзяного екстракту (2,0 г/л) та K_2HPO_4 (0,4 г/л).

За результатами аналізу літератури оптимальною температурою культивування визначено 28 °C [Ghasemi et al., 2013; Tsarenko et al., 2013].

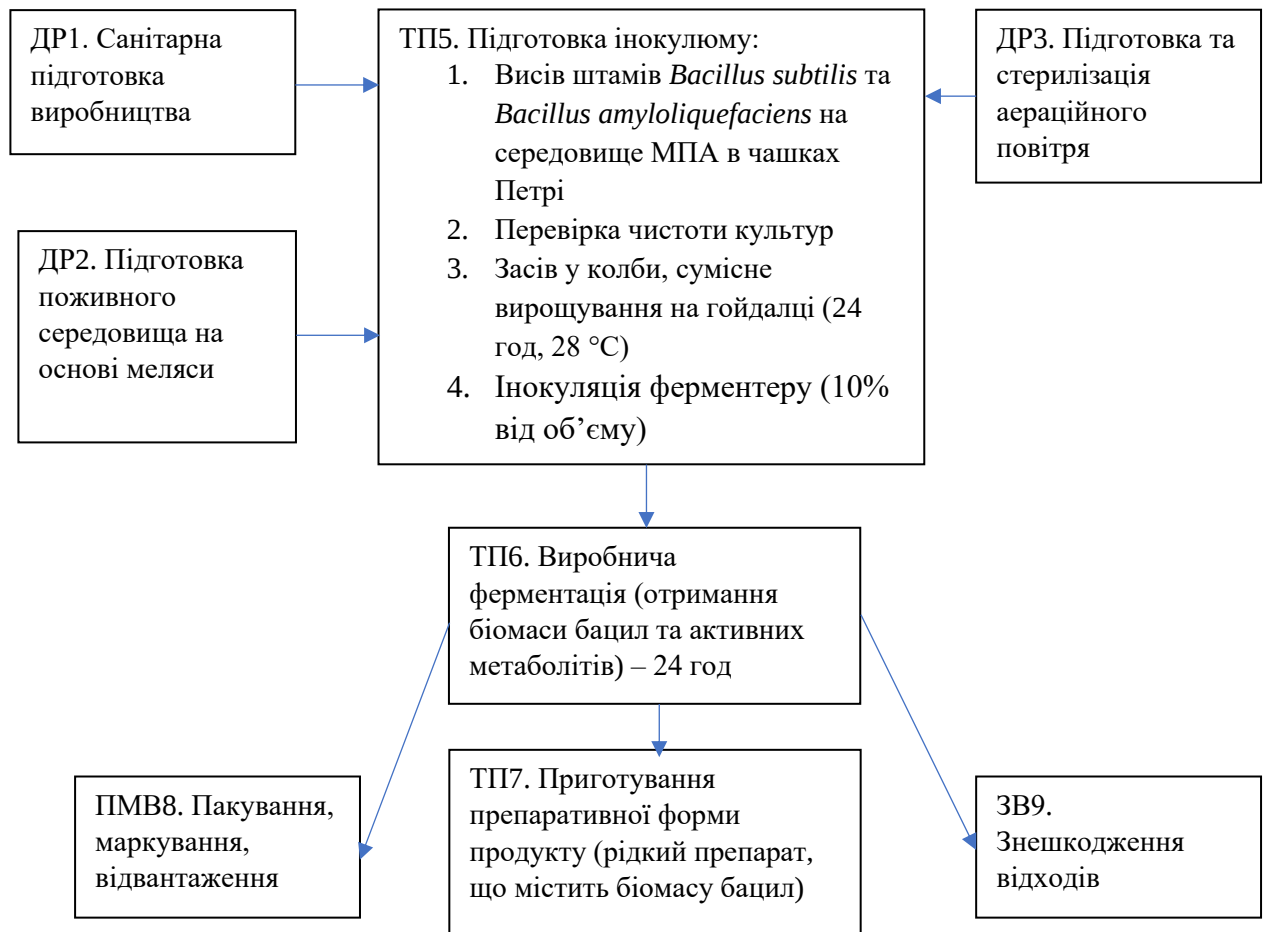


Рис. 1. Технологічна схема отримання препарату для біологічного захисту сільськогосподарських культур на основі споротвірних бактерій

Препарат для біозахисту сільськогосподарських рослин представляє собою рідку культуру бактерій видів *B. subtilis* та *B. amyloliquefaciens*, які здатні до продукування біологічно активних метаболітів, що мають пригнічувальну дію щодо збудників бурого слизоточіння та плямистості листя томатів, бактеріального опіку яблуні та рису, бурої бактеріальної гнилі, чорної бактеріальної плямистості томату.

Для отримання препарату необхідний стерильний ферментер та підготоване стерильне повітря для аерації середовища. Споротвірні бактерії культивують у рідкому середовищі, склад якого наведено вище, при

температурі 28 °С протягом 24 год. Після завершення інкубації біомасу бактерій разом з культуральною рідиною розливають у флакони. Препарат застосовують у вигляді рідини для внесення в ґрунт та обробки рослин.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті пошуку в базі даних антимікробних пептидів CAMPr3 у досліджуваних штамів було виявлено 24 антимікробні сполуки, які можуть бути потенційними факторами антагонізму щодо збудників захворювань сільськогосподарських культур (табл. 2).

Таблиця 2

Результати пошуку потенційних захисних сполук в базі даних CAMPr3 (колекція антимікробних пептидів)

Вид	Виявлені сполуки	
	Кількість сполук	Назва сполуки
<i>Bacillus subtilis</i>	14	Субпептин JM4-B
		Ерицин S
		Антимікробний пептид LCI
		Лантибіотик субтилін
		Ерицин A
		Бацілібактин
		Фенгіцин
		Субланцин 168
		Ентіанін
		пептид NRWС
		Субтилозин A1
		Бактеріоцин
		Антибактеріальний білок LC3
		Субтилін
<i>Bacillus atrophaeus</i>	1	Субтилозин A
<i>Priestia megaterium</i>	1	Білковий антибіотик, сполука-кандидат
<i>Bacillus pumilus</i>	1	Плантазоліцин
<i>Bacillus licheniformis</i>	4	Ліхеніцидин
		Лантибіотик ліхеніцидин BK21 A1 / A2
		Ліхенін
<i>Bacillus cereus</i>	3	Тіоцилін
		Лантибіотик епідермін
		Лантибіотик лактицин
Усього	24	

Найбільшу кількість сполук (14) виявлено у *Bacillus subtilis*. *Bacillus licheniformis* виявлено 4 антимікробних пептиди, у *Bacillus cereus* – 3, у *Bacillus atrophaeus*, *Priestia megaterium*, *Bacillus pumilus* виявлено по 1 сполуці. У решти видів антимікробних пептидів не виявлено.

За результатами пошуку в базі даних AntiSMASH виявлено 52 біосинтетичних генних кластери, які можуть бути задіяні в біосинтезі потенційних захисних для рослин сполук (табл. 3). Отже, ефективність пошуку за структурою генів у базі даних AntiSMASH є вищою, ніж у CAMPR3.

Найбільшу кількість кластерів (9) виявлено у *Bacillus subtilis*, у *Bacillus licheniformis* та *Bacillus amyloliquefaciens* – по 8 кластерів, у *Bacillus atrophaeus* – 7. У *Bacillus pumilus* – 6. У решти видів виявлено менше 5 кластерів.

Найвищі ступені подібності виявлено у *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* та *Bacillus atrophaeus*.

Таблиця 3

Результати пошуку біосинтетичних генних кластерів, що можуть бути задіяні в синтезі потенційних захисних сполук, в базі даних AntiSMASH

Вид	Виявлені генні кластери		
	Кількість кластерів	Назва сполуки	% подібності
<i>Bacillus subtilis</i>	9	Петробактин	100
		Бацилібактин	100
		Фенгіцин	100
		Фактор пригнічення спороутворення	100
		Сурфактин	82
		Бацилін	100
		Субланцин 168	100
		Субтилозин А	100
		Бацилізин	100
<i>Bacillus atrophaeus</i>	7	Бацілен	100
		Фенгіцин	100
		Бацилібактин	100
		Лоциломіцин	87
		Сурфактин	86
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	2	Фенгіцин	46

		Продовження табл. 3	
<i>Bacillus pumilus</i>	6	Бацілібактин	30
		Плантазоліцин	91
		Бацілізин	85
		Бацілібактин	80
		Ліхенізин	78
		Шизокінен	60
		Фенгіцин	53
<i>Brevibacillus reuszeri</i>	1	Корінецин	13
<i>Kocuria rhizophila</i>	3	Терпен	25
		Мікроанзаміцин	7
		Леукоцикліцин Q	5
<i>Bacillus licheniformis</i>	8	Ліхеніцидин	100
		Бацілібактин	100
		Ліхенізин	100
		Пульхеррімінова кислота	66
		Шизокінен	60
		Фенгіцин	53
		Ліхенін	60
		Ліхеніцидин A1	60
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	8	Дифіцидин	100
		Бацілібактин	100
		Бацілізин	100
		Макролактин Н	100
		Бацілен	100
		Фенгіцин	100
		Сурфактин	91
		Плантазоліцин	91
<i>Gottfriedia luciferensis</i>	3	Глідобактин	10
		Глідобактин В	10
		Глідобактин С	10
<i>Brevibacillus centrosporus</i>	1	Таурамамід	13
<i>Priestia megaterium</i>	4	Шизокінен	62
		Пеніцидин	28
		Полікетид+NRP	22
		Сурфактин	13
Усього		52	

Аналіз співпадінь даних, отриманих в двох базах (табл.), показав, що у більшості випадків у базах виявляється потенційна здатність до синтезу різних

сполук. Отже, при прогнозуванні антагоністичної активності не можна обмежуватися якоюсь однією базою.

Таблиця 4

Відповідність спектрів метаболітів, виявлених у споротвірних бактерій при аналізі баз CAMPR3 та AntiSMASH

Вид	Макисмальна кількість виявлених активних метаболітів	Кількість співпадінь
<i>Bacillus subtilis</i>	14	1
<i>Bacillus atrophaeus</i>	7	0
<i>Priestia megaterium</i>	4	0
<i>Bacillus pumilus</i>	6	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	8	2
<i>Bacillus cereus</i>	3	0
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	2	0
<i>Brevibacillus reuszeri</i>	1	0
<i>Kocuria rhizophila</i>	3	0
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	8	0
<i>Gottfriedia luciferensis</i>	3	0
<i>Brevibacillus centrosporus</i>	1	0

На основі аналізу даних, отриманих за двома базами, було відібрано найпоширеніші вторинні метаболіти з активністю щодо фітопатогенів та зібрано інформацію щодо їх механізмів дії та потенційного спектру активності. Результати представлені в табл. 5. Усі сполуки, наведені в таблиці, ідентифіковані за наявністю біосинтетичних генних кластерів у геномах досліджених видів спороутворюючих бактерій з коефіцієнтом подібності 100%.

Таблиця 5

**Спектр та механізми дії метаболітів споротвірних бактерій,
потенційно придатних для біологічного захисту рослин**

Вид	Назва сполуки	Спектр активності	Механізм дії
<i>Bacillus subtilis</i>	Бацилібактин	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Утворення пор у клітинній мембрані
	Фенгіцин	<i>R. solanacearum</i> , <i>X. euvesicatoria</i> ; <i>X. axonopodis</i> pv. <i>esicatoria</i>	Інгібування стеринів, фосфоліпідів та олеїнової кислоти
	Бациллін	<i>E. amylovora</i>	Утворення пор у клітинній мембрані
	Бацилізин	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> , <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> ; <i>E. amylovora</i>	Утворення пор у клітинній мембрані
<i>Bacillus atrophaeus</i>	Фенгіцин	<i>R. solanacearum</i> , <i>X. euvesicatoria</i> ; <i>X. axonopodis</i> pv. <i>esicatoria</i>	Інгібування стеринів, фосфоліпідів та олеїнової кислоти
	Бацилібактин	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Утворення пор у клітинній мембрані
<i>Bacillus licheniformis</i>	Бацилібактин	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Утворення пор у клітинній мембрані
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Дифіцидин	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> , <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> ; <i>E. amylovora</i> ; <i>R. solanacearum</i>	Утворення пор у клітинній мембрані
	Бацилібактин	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Утворення пор у клітинній мембрані
	Бацилізин	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> , <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> ; <i>E. amylovora</i>	Утворення пор у клітинній мембрані
	Фенгіцин	<i>R. solanacearum</i> , <i>X. euvesicatoria</i> ; <i>X. axonopodis</i> pv. <i>esicatoria</i>	Інгібування стеринів, фосфоліпідів та олеїнової кислоти

У результаті аналізу у досліджуваних видів виявлено потенційну здатність до захисту рослин від бурого слизоточіння та плямистості листя томатів (збудник *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), бактеріального опіку яблуні, рису (збудники *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*), бурої бактеріальної гнилі (*Ralstonia solanacearum*), чорної бактеріальної плямистості томату (*Xanthomonas euvesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *esicatoria*).

Найширший спектр метаболітів та антагоністичної активності виявлено у *Bacillus subtilis* та *Bacillus amyloliquefaciens*, у яких виявлено сполуки, здатні пригнічувати ріст усіх вказаних вище патогенів. Культури, що належать до цих видів, можуть бути рекомендовані для створення на їх основі препаратів для біологічного захисту рослин.

На основі проведеного пошуку складено технологічну схему отримання препарату для біозахисту сільськогосподарських культур (розд. 2.3).

ВИСНОВКИ

1. Проаналізовано видовий склад спороутворюючих бактерій, виділених з Чорного моря, що наявні у колекції морських мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології, виявлено найбільшу поширеність *Bacillus subtilis* (16 за 63 штамів, що склало 25%).
2. На основі аналізу інформації у базах даних AntiSMASH та CAMPR3 у досліджених видів виявлено відповідно 52 та 24 сполуки з потенційною здатністю до пригнічення росту фітопатогенів.
3. У досліджених видів споротвірних бактерій виявлено здатність до синтезу метаболітів з пригнічувальною дією щодо збудників бурого слизоточіння та плямистості листя томатів, бактеріального опіку яблуні, рису, бурої бактеріальної гнилі, чорної бактеріальної плямистості томату. Найширший спектр активних метаболітів (по 4) виявлено у *Bacillus subtilis* та *Bacillus amyloliquefaciens*.
4. На основі отриманих результатів складено технологічну схему отримання препарату для біозахисту рослин з морських споротвірних бактерій.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Пилипенко І.В. Склад мікробних контамінантів овочевої сировини / І.В. Пилипенко, Я.Б. Пауліна, Л.М. Пилипенко // Мікробіологія і біотехнологія.– 2015.– № 3 (31).– Р. 83 – 95.
2. Arnesen L.P.S. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins / L.P.S.Arnese, A. Fogerlund, P.E. Granum // FEMS Microbiol. – 2008.– № 32. – Р. 579–606.
3. Biesta-Peters E.G. Characterization and Exposure Assessment of Emetic *Bacillus cereus* and Cereulide Production in Food Products on the Dutch Market [Text] / E.G. Biesta-Peters, S. Dissel, M.W. Reij, M.H. Zwietering, H. Paul // Journal of Food Protection. – 2016.– № 79(2).– Р. 230–238.
4. Dierick K. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*–associated food poisoning / K. Dierick, E.V. Coillie, I.J. Swiecicka // Clin Microbiol. – 2017.– №43.– Р. 4277–4279.
5. Dohmae S. *Bacillus cereus* nosocomial infection from reused towels in Japan / S. Dohmae // J. Hosp.Infect. – 2008.– № 69.– Р. 361–367.
6. Edward J. B. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen / J.B. Edward // Clinical Microbiology. – 2010.– № 23.– Р. 382–398.
7. Fan B. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* Species Complex / B. Fan // Frontiers in Microbiology. – 2017. – Vol. 8. – Р. 64-72.
8. Ghasemi S. Optimisation of a cost-effective culture medium for the large-scale production of *Bacillus subtilis* UTB96 / Ghasemi S., Ahmadzadeh M. // Archives of Phytopathology and Plant Protection. – 2013. – Vol. 46. – Р. 10.1080.
9. Hauge S. Food poisoning by aerobic spore-forming bacilli / S. Hauge // J Appl Bact. – 1955. – № 18. – Р. 591-595.
10. Mossel D.A. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods / D.A. Mossel, M.J. Koopman, E.J. Jongerius // Applied Microbiology.– 1953. – № 15. – Р 650–653.

11. Pandey S. Role of heavy metal resistant *Ochrobactrum* sp. and *Bacillus* spp. strains in bioremediation of a rice cultivar and their PGPR like activities / S. Pandey, P. K. Ghosh, S. Ghosh // J. Microbiol. – 2013. – Vol. 51. – P. 11–17.
12. Park S.H. Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR / S.H. Park, H.J. Kim, J.H. Kim, T.W. Kim // J. Microbial Biotechnol. – 2007.– №17 (7).– P. 1177 – 1182.
13. Pérez-García A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture / A. Pérez-García, D. Romero, A. de Vicente // Current Opinion in Biotechnology. – 2011. – Vol. 22, №2. – P. 187–193.
14. Pisu I. Intossicazione alimentare del *Bacillus cereus* / I. Pisu, L. Stazzi // Nuovi Ann. –1952.– № 14.– P. 325–329.
15. Poulaki E. G. *Bacillus* species: a factory of plant protective volatile organic compounds / Poulaki E. G., Tjamos S. E. // Journal of applied microbiology. 2023. – Vol. 134. – P. 48-60.
16. Qurashi A. W. Osmolyte accumulation in moderately halophilic bacteria improves salt tolerance of chickpea / A. W. Qurashi, A. N. Sabri // Pakist. J. Bot. – 2013. – Vol. 45. – P. 1011–1016.
17. Rahman A. Induced systemic resistance responses in perennial ryegrass against *Magnaporthe oryzae* elicited by semi-purified surfactin lipopeptides and live cells of *Bacillus amyloliquefaciens* / M. K. Solanki, A. S. Robert, R. K. Singh, S. Kumar // Mol. Plant Pathol. – 2015. – Vol. 16. – P. 546–558.
18. Sandra M. The *Bacillus* Chapter has been updated with the inclusion of a new optional chromogenic agar, Bacara agar, for the detection and enumeration of *Bacillus cereus* in foods / M. Sandra // Bacteriological Analytical Manual. – 2012. – Vol. 2. – P. 102-108.
19. Scallan E. Foodborn Illness Acquired in the United States – Major Pathogens / E. Scallan // Emerg Infect Dis. – 2018.– № 17(1).– P. 7– 15.

20. Shafi J. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & biotechnological equipment* / J. Shafi, H. Tian, M. Ji. – 2017. – Vol. 31, № 3. – P. 446–459.
21. Shen Y. Screening of compound-formulated *Bacillus* and its effect on plant growth promotion / Y. Shen // *Frontiers in plant science*. – 2023. – Vol. 14. – P. 28-40.
22. Solanki M. K. Characterization of mycolytic enzymes of *Bacillus* strains and their bio-protection role against *Rhizoctonia solani* in tomato / M. K. Solanki, A. S. Robert, R. K. Singh // *Curr. Microbiol.* – 2012. – Vol. 65. – P. 330–336.
23. Tsarenko I. Optimization of nutrient medium for cultivation of *Bacillus subtilis* IMV V-7023 / I. Tsarenko, A.A. Roï, I.K. Kudrish // *Mikrobiol Z.* – 2011. – Vol. 73(2). – P. 13-19.
24. Tsotetsi T. *Bacillus* for Plant Growth Promotion and Stress Resilience: What Have We Learned? / T. Tsotetsi // *Plants*. – 2022. – Vol. 11, № 19. – P. 2482.
25. Wang X. The ecological roles of *Bacillus thuringiensis* within phyllosphere environments / X. Wang, Y. Xue, M. Han, Y. Bu // *Chemosphere*. – 2014. – Vol. 108. – P. 258–264.
26. Xu M. Bacterial community compositions of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* (HYT-12-1) on tomato seedlings / M. Xu, J. Sheng, L. Chen, Y. Men, // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. Vol. 30. – P. 835–845.
27. Yang R. The inhibitory mechanisms by mixtures of two endophytic bacterial strains isolated from *Ginkgo biloba* against pepper phytophthora blight / R. Yang, X. Fan, X. Cai, F. Hu // *Biol. Control*. – 2015. – Vol. 85. – P. 59–67.
28. Zebelo S. Rhizobacteria activates (+)- β -cadinene synthase genes and induces systemic resistance in cotton against beet armyworm (*Spodoptera exigua*) / S. Zebelo, Y. Song, J. W. Kloepper, H. Fadamiro // *Plant Cell Environ.* – 2016. – Vol. 39. – P. 935–943.

29. Zhang D. OsC6, encoding a lipid transfer protein, is required for postmeiotic anther development in rice / D. Zhang, W. LiangYin, C. Zong, J. Gu // *Plant Physiol.* – 2010. – Vol. 154. – P. 149–162.

30. Zhao L. Advances and prospects in biogenic substances against plant virus: a review / L. Zhao, C. Feng, K. Wu, W. Chen // *Pest. Biochem. Physiol.* – 2017. – Vol. 135. – P. 15–26.