

ENDOPHYTIC BACTERIA FROM SEEDS OF SCOTS PINE

V. Shopinskyi¹, L. Butsenko^{1,2}

¹National University of Food Technologies

²Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine

Key words:

Bacillus amyloliquefaciens
Bacillus pumilus
MALDI-TOF mass spectrometry
Antagonism
Biological control of phytopathogens

Article history:

Received 11.03.2025
Received in revised form 28.03.2025
Accepted 11.04.2025

Corresponding author:

L. Butsenko

E-mail:

l.m.butsenko@gmail.com

Citation: Шопінський В. В., Буценко Л. М. (2025). Ендодітні бактерії насіння сосни звичайної. *Наукові праці НУХТ*, 31(2), 61—72. DOI: 10.24263/2225-2924-2025-31-2-7

ABSTRACT

Endophytic bacteria isolated from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seeds were investigated. The effectiveness of seed surface sterilization was confirmed by the absence of microorganism growth on nutrient media, indicating the endophytic origin of the isolated strains. It was found that endophytic bacteria were present in 15—20% of Scots pine seeds, indicating a different level of colonization and selective nature of the interaction between microorganisms and the host plant. Morphological, cultural, physiological and biochemical analysis of the isolated strains (E7, E8, E9, E10, E11, and E12) confirmed their affiliation with the genus *Bacillus*. Endophytic bacteria from pine seeds are aerobic, Gram-positive, spore-forming rods that form opaque, pigmentless colonies with a wrinkled surface. They are capable of hydrolyzing gelatin and growing on media containing 7% NaCl. The MALDI-TOF mass spectrometry method, with a high degree of reliability (91.0%—99.9%), identified endophytic bacteria from pine seeds as belonging to the species *Bacillus amyloliquefaciens* (80% of isolates) and *Bacillus pumilus* (20% of isolates). The antagonistic activity of the isolated strains against phytopathogenic bacteria, which cause the most common plant diseases, was confirmed. The *Bacillus pumilus* E11 strain exhibited the highest antagonistic activity, with growth inhibition zones measuring 35±2 mm for *Pseudomonas syringae*, 32±2 mm for *Xanthomonas campestris*, 33±2 mm for *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, and 20±1 mm for *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*. These findings enhance the understanding of the diversity and functional role of endophytic bacteria in Scots pine seeds and highlight their potential as biological control agents against phytopathogens.

ЕНДОФІТНІ БАКТЕРІЇ НАСІННЯ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ**В. В. Шопінський¹, Л. М. Буценко^{1,2}**¹Національний університет харчових технологій²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України

У статті досліджено ендоефітні бактерії, ізольовані з насіння сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.). Ефективність поверхневої стерилізації насіння сосни доведена відсутністю росту мікроорганізмів на поживних середовищах, що підтверджує ендоефітне походження виділених ізолятів. Встановлено, що ендоефітні бактерії були присутні у 15—20% насіння сосни звичайної, що вказує на нерівномірність колонізації та селективний характер взаємодії між мікроорганізмами й рослиною-хазяїном. Морфолого-культуральний і фізіолого-біохімічний аналіз найбільш типових ізолятів (E7, E8, E9, E10, E11 та E12) підтвердив їх приналежність до роду *Bacillus*. Ендоефітні бактерії з насіння сосни є аеробними грампозитивними спороутворюючими паличками, які утворюють непрозорі колонії без пігменту із зморшкуватою поверхнею, здатні гідролізувати желатин і рости на поживних середовищах з 7% NaCl. Методом MALDI-TOF мас-спектрометрії з високим ступенем достовірності (91,0—99,9%) встановлено приналежність ендоефітних бактерій із насіння сосни до видів: *Bacillus amyloliquefaciens* (80% ізолятів) та *Bacillus pumilus* (20% ізолятів). Підтверджено антагоністичну активність виділених ізолятів стосовно фітопатогенних бактерій, які є збудниками найпоширеніших хвороб рослин. Найвищою антагоністичною активністю характеризується штам *Bacillus pumilus* E11. Розмір зон затримки росту цим штамом становив для *Pseudomonas syringae* 35±2 мм, *Xanthomonas campestris* 32±2 мм, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 33±2 мм та *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 20±1 мм. Отримані результати розширюють уявлення про різноманітність і функціональну роль ендоефітних бактерій насіння сосни звичайної, які можуть бути перспективними як агенти біологічного контролю фітопатогенів.

Ключові слова: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, MALDI-TOF мас-спектрометрія, антагонізм, біологічний контроль фітопатогенів.

Постановка проблеми. Ендоефітні бактерії — це мікроорганізми, які колонізують внутрішні тканини рослин і встановлюють симбіотичні відносини з рослинами-хазяїнами (Hardoim та ін., 2015; White та ін., 2019). Ці мікроорганізми можуть населяти різні частини рослин: коріння, стебла, листя, плоди і насіння. Серед ендоефітних бактерій найпоширенішими є представники родів *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Serratia*, *Pantoea* тощо (Compant, Samad, Faist, & Sessitsch, 2019; Santoyo, Moreno-Hagelsieb, Orozco-Mosqueda, & Glick, 2016). Ендоефітні бактерії можуть сприяти покращенню проростання насіння, стимуляції росту та захисту рослин від патогенів завдяки їх важливим характеристикам: продукувати фітогормони (ауксини, гібереліни, саліцилову і жасмонову кислоту тощо), біологічно активні метаболіти та антагоністичні сполуки (Rosenblueth, & Martínez-Romero, 2006).

Традиційні агротехнічні шляхи захисту рослин, засновані на використанні хімічних препаратів, не завжди є ефективними й екологічно безпечними та призводять до забруднення довкілля і розвитку резистентності до патогенних мікроорганізмів (Comrants, Samad, Faist, & Sessitsch, 2019; Pirttilä, & Frank, 2011). Тож розробка екологічно безпечних біотехнологічних препаратів на основі ендоефітних бактерій з рістстимулювальною та протекторною дією є актуальним і перспективним напрямком досліджень.

Огляд останніх досліджень і публікацій. Ендоефіти беруть важливу участь у метаболічних процесах рослин (White та ін., 2019):

- стимулюють ріст і розвиток рослини-хазяїна (покрощують поглинання поживних речовин);
- підвищують стійкість до біотичних/абіотичних стресів (активують захисні функції рослини, проявляють антагоністичну активність щодо фітопатогенів).

Особливий інтерес представляють ендоефітні бактерії роду *Bacillus*, які характеризуються здатністю утворювати ендоспори, що забезпечує їх виживання в несприятливих умовах навколишнього середовища. Ці мікроорганізми характеризуються широким спектром корисних властивостей для рослинництва: здатність до фіксації атмосферного азоту, солубілізація фосфатів, продукування фітогормонів і сидерофорів тощо (Bolivar-Anillo та ін., 2021; Comrants, Samad, Faist, & Sessitsch, 2019).

Вивчення ендоефітного мікробіому насіння сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) поглибить знання про його склад і функціональність, дасть змогу створити науково обґрунтовані біотехнологічні підходи до вирощування цієї деревної породи (Pirttilä, & Frank, 2011).

З точки зору лісового господарства сосна звичайна (*Pinus sylvestris* L.) є однією з найважливіших лісоутворюючих порід у помірній зоні Європи. Однак її вирощування супроводжується низкою проблем (Pirttilä, & Frank, 2011):

- ураженням сянців патогенними мікроорганізмами (грибами роду *Fusarium* (трахеомікоз), *Armillaria*, *Heterobasidion* та іншими кореневими гнилями);
- зниженням схожості насіння, виживаності та повільним ростом сянців в умовах абіотичних стресів (високотемпературного і низькотемпературного стресу, впливу важких металів, сольового стресу тощо).

Важливо відзначити біологічні особливості репродукції сосни звичайної у природних умовах. За даними досліджень (Гордієнко, & Гордієнко, 2005), сосна звичайна (*Pinus sylvestris* L.) починає утворювати насіння досить пізно: на 14—18 рік росту. При цьому продуктивність сосни є достатньо високою, утворюється значна кількість насінин: від 32 тис. до 709 тис. на 1 га. Однак природне поновлення сосни звичайної відбувається слабо і є недостатньо ефективним. Саме тому в Україні поширеним є штучне відновлення насаджень цієї цінної лісової породи (Сірук, 2010).

Для отримання якісного посівного матеріалу сосни звичайної необхідним є оброблення її насіння перед пророщуванням препаратами з антистресовими і фітостимулювальними властивостями (Мажула, & Дишко, 2014).

Дослідження останніх років демонструють зростаючий інтерес до вивчення ендоефітних мікроорганізмів та їх потенціалу для покращення росту рослин й захисту від патогенів. Виявлено ефективність використання ендоефітних бактерій, виділених з одних видів рослин, для стимуляції росту та захисту інших видів (Vogel et al., 2022). Такі дослідження підтверджують актуальність пошуку та вивчення ендоефітних бактерій з різних видів рослин, включаючи деревні породи, для

розробки біопрепаратів сільськогосподарського та лісгосподарського призначення.

Використання ендоефітних бактерій, виділених безпосередньо з насіння сосни звичайної, є одним із перспективних напрямів у процесі штучного відновлення цієї лісової породи. Ці мікроорганізми, будучи природно адаптованими до рослини-хазяїна, можуть стати основою для розробки ефективних біотехнологічних препаратів, спрямованих на покращення процесів вирощування сосни. Такий підхід є особливо актуальним у контексті сучасних екологічних викликів і необхідності розробки сталих методів лісовідновлення.

Метою статті є дослідження ендоефітних бактерій, виділених із насіння сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.), ідентифікація видового складу ендоефітних бактерій, визначення їх антагоністичної активності щодо фітопатогенів.

Матеріали і методи. У дослідженні використано насіння сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) І класу якості, отримане у 2023 р. в Бучанському лісовому господарстві (Київська область).

Для вивчення антагоністичної активності ендоефітів з насіння сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) використано колекційні штами фітопатогенних бактерій:

- *Pseudomonas syringae* 8511;
- *Pseudomonas fluorescens* 8573;
- *Xanthomonas campestris* 80036;
- *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 8982;
- *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 102;
- *Agrobacterium tumefaciens* 8628.

Штами фітопатогенних бактерій для здійснення досліджень було отримано з колекції культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Для виділення ендоефітних бактерій використовувався метод поверхневої стерилізації насіння сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) з подальшим контролем стерильності (Гвоздяк, Кабашна, Пасічник, & Макаруч, 2001). Метод стерилізації включав промивання протягом 15 хв стрілиною водогінною водою, 5-хвилинну витримку в розчині етанолу (70%) та наступну 20-хвилинну експозицію в 16,5% перекисі водню. Процедуру повторювали двічі для забезпечення повної стерильності поверхні. Після цього оброблене насіння занурювали в розчин етанолу (96%) та обпалювали. Простерилізоване насіння розтирали у стерильній ступці, отриману масу висівали на картопляний агар і середовище LB в чашки Петрі та інкубували посіви при температурі 27 °C протягом 24—48 годин. Проводили моніторинг росту бактеріальних колоній з подальшим відбором ізолятів для ідентифікації та досліджень антагоністичної активності.

Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості бактерій визначали класичними мікробіологічними методами (Патика та ін., 2014; Романовська, Рокитко, Шилин, & Малашенко, 2003).

Ідентифікацію виділених ізолятів бактерій здійснювали за допомогою методу мас-спектрометрії (MALDI-TOF — Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) на мас-спектрометрі VITEK MS (Tsuchida, Hiroshi, & Tomohiro, 2020; Mellmann та ін., 2008). Готували калібрувальну криву штаму *Escherichia coli* ATCC 8739, виро-

щеного впродовж 24 годин. Наносили тонкий шар клітин цього штаму на калібрувальну лунку-мішень. Одразу ж додавали 1 мкл матриксу на кожну калібрувальну лунку-мішень. Витримували час до повного висихання матеріалу на лунках-мішенях. Потім готували протягом 18—24 год чисті культури досліджуваних бактерій. Ізольовану колонію петлею об'ємом 1 мкл наносили в центр лунки-мішені цільового слайду та розподіляли тонким шаром по лунці-мішені. негайно додавали до нанесеної культури 1 мкл матриксу в центр лунки-мішені. Витримували час до повного висихання лунки-мішені. Поміщали слайд у прилад і запускали процес ідентифікації. У разі збігу мас-спектр досліджуваного штаму бактерій з одним із спектрів бази даних референтних видів бактерій, система його ідентифікує. Діапазон процентних ймовірностей для правильної ідентифікації становить від 60 до 100 (Tsuchida, Hiroshi, & Tomohiro, 2020).

Визначення антагоністичної активності ендоефітів, виділених із насіння сосни звичайної, до колекційних штамів фітопатогенів здійснювали *in vitro* методом радіальних штрихів (сумісного культивування антагоніста та досліджуваних ізолятів ендоефітів) за класичною методикою (Патика та ін., 2017). Оцінювання активності виконано за розмірами зон затримки росту фітопатогенів.

Усі експерименти виконано в триразовій повторності. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за використання пакета прикладних програм Statistica 6.0, використовуючи вбудовані функції у Microsoft Excel.

Викладення основних результатів дослідження. Поверхнева стерилізація насіння є критичним етапом у процесі виділення ендоефітних мікроорганізмів. Ефективність цієї процедури безпосередньо впливає на достовірність і коректність отриманих результатів. Застосований у дослідженні метод стерилізації продемонстрував високу ефективність щодо елімінації епіфітної мікробіоти, що було підтверджено відсутністю росту мікроорганізмів за культивування стерилізованого насіння на поживних середовищах. Підтверджена стерильність насіння сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) є доказом того, що виділені ізоляти мають ендоефітне походження, тобто колонізують внутрішні тканини насіння. Отже, застосована методика стерилізації забезпечила можливість достовірної ідентифікації ендоефітної мікробіоти насіння, виключивши контамінацію епіфітними мікроорганізмами.

З простерилізованого насіння було ізольовано бактерії, що утворювали біло-сірі непрозорі колонії з різаними краями (рис. 1). Ендоефітні бактерії були виділені з 15—20% досліджуваного насіння сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.). Це свідчить про нерівномірність колонізації насіння сосни звичайної ендоефітами та вказує на селективний характер взаємодії між мікроорганізмами та рослиною-хазяїном.

Для подальшого дослідження відбирали найбільш типові за морфологією ізоляти: E7, E8, E9, E10, E11 та E12 (рис. 1).

Виділені ізоляти (E7—E12) були однаковими за своїми морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними властивостями. Вони утворювали непрозорі колонії без пігменту із зморшкуватою поверхнею. Ізоляти розріджували желатин та росли на поживному середовищі з 7% хлориду натрію. Ізольовані бактерії є аеробними грампозитивними спороутворюючими паличками. Встановлено значну подібність ізолятів з насіння сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) з бактеріями видів *Bacillus amyloliquefaciens* та *Bacillus pumilus* за більшістю досліджених ознак, що дає змогу віднести виділені ізоляти до роду *Bacillus* (табл. 1).



Рис. 1. Колонії ендоефітних бактерій з насіння сосни звичайної (ізолят E7)

Таблиця 1. Властивості ізолятів з насіння сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) і бактерій роду *Bacillus*

Властивість	Ізоляти з насіння сосни звичайної E7-E12	<i>B. amyloliquefaciens</i> (за даними De Vos та ін., 2009; Priest, Goodfellow, Shute, & Berkeley, 1987; Ngalimat та ін., 2021; Priest, Goodfellow, & Todd, 1988; Logan, & De Vos, 2015; Грабова, Драговоз, Зелена, Остапчук, & Авдєєва, 2016)	<i>B. pumilus</i> (за даними De Vos та ін., 2009; Knight, & Proom, 1950; Priest, Goodfellow, & Todd, 1988; Reva, Smimov, Pettersson, & Priest, 2002; Logan, & De Vos, 2015)
Колонії	Непрозорі, без пігменту, зморшкувата поверхня	Непрозорі, без пігменту, з нерівними краями, зморшкуватою поверхнею	Непрозорі, непігментовані, гладкі або зморшкуваті з нерівними краями
Форма клітин	Палички	Прямі палички, (0,7-0,9 × 1,8-3,0) μm, поодинокі або у коротких ланцюжках	Прямі палички, (0,6—0,7×2,0—3,0) μm, поодинокі або у коротких ланцюжках
Утворення спор	+ еліпсоїдні	+ еліпсоїдні	+ еліпсоїдні, циліндричні або овальні
Фарбування за Грамом	+	+	+ / 0
Ріст на середовищі з 7% NaCl	+	+	+
Ріст на середовищі з желатину	+	+	+
Ріст на середовищі з глюкозою аеробно	+	+	+
Ріст на середовищі з глюкозою анаеробно	-/+*	+/-	—

Примітка: * — лише слабо проявлено для ізолятів E7 та E11.

Згідно з результатами, які наведені в табл. 1, визначено, що ізоляти (E7—E12) з насіння сосни звичайної за морфолого-культуральними ознаками відповідають обом видам роду *Bacillus*, але за деякими ключовими характеристиками (вид колоній, форма спор, деяка здатність до росту в анаеробних умовах) більше наближаються до *B. amyloliquefaciens*.

Ідентифікацію досліджуваних ізолятів здійснювали методом матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації (MALDI-TOF мас-спектрометрії).

У результаті проведеного MALDI-TOF аналізу було успішно ідентифіковано таксономічну приналежність ендоефітних бактерій, виділених з насіння сосни звичайної: E7, E8, E10, E11 та E12. Переважна більшість ізолятів належить до виду *Bacillus amyloliquefaciens* (рис. 2). Ідентифіковано також ізоляти виду *Bacillus pumilus* (рис. 3).

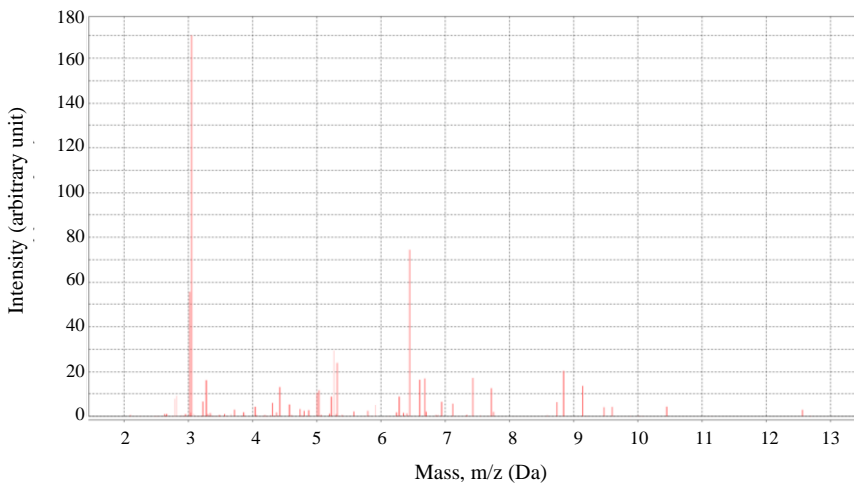


Рис. 2. Мас-спектр ендоефітних бактерій *B. amyloliquefaciens* E7

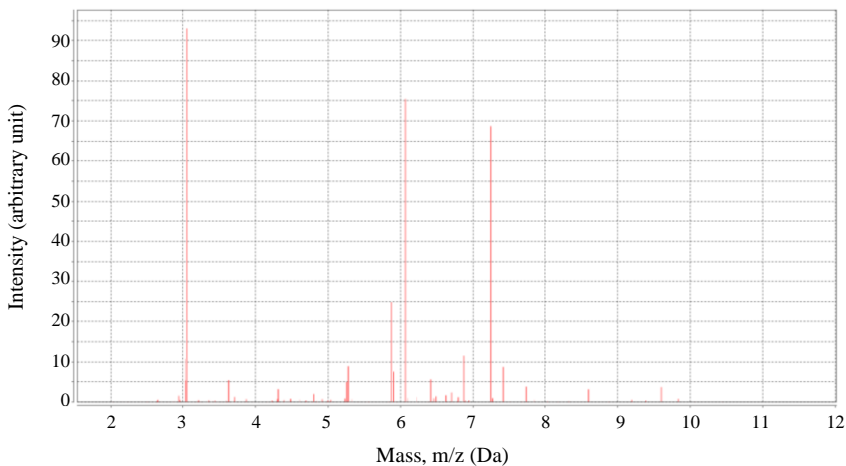


Рис. 3. Мас-спектр ендоефітних бактерій *B. pumilus* E11

Усі досліджувані ізоляти були ідентифіковані з високим ступенем достовірності: 91,0%—99,9% (табл. 2).

Таблиця 2. Результати ідентифікації бактеріальних ізолятів за допомогою MALDI-TOF

Ізолят	Ідентифіковані ендоефітні бактерії	Точність ідентифікації, %
E7	<i>B. amyloliquefaciens</i>	99,9
E8	<i>B. amyloliquefaciens</i>	99,9
E10	<i>B. amyloliquefaciens</i>	99,9
E11	<i>B. pumilus</i>	99,9
E12	<i>B. amyloliquefaciens</i>	91,0

Ендоефітна мікробіота насіння сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) представлена двома видами роду *Bacillus*: *B. amyloliquefaciens* та *B. pumilus* (рис. 4). Переважаючим видом ендоефітних бактерій із насіння сосни звичайної є *B. amyloliquefaciens* (80% від загальної кількості ідентифікованих ізолятів). 20% ізолятів належать до *B. pumilus*. Таке співвідношення може свідчити про кращу пристосованість *B. amyloliquefaciens* до умов внутрішнього середовища насіння сосни звичайної та його більш активну здатність до колонізації тканин рослини-хазяїна.

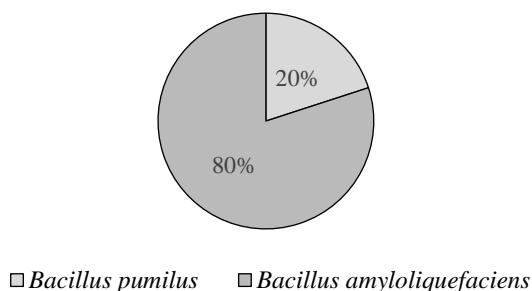


Рис. 4. Видовий розподіл ендоефітних бактерій, ізольованих з насіння сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.)

Результати дослідження антагоністичної активності ендоефітних бактерій з насіння сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) стосовно фітопатогенних бактерій представлені в табл. 3.

Таблиця 3. Антагоністична активність ендоефітних бактерій, виділених з насіння *Pinus sylvestris* L., щодо фітопатогенних бактерій

Ендоефітні бактерії	<i>P. syringae</i> 8511	<i>P. fluorescens</i> 8573	<i>X. campestris</i> 80036	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> 8982	<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 10 ₂	<i>A. tumefaciens</i> 8628
	Розмір зони затримки росту, мм					
<i>B. amyloliquefaciens</i> E7	30±2	5±1*	30±2	15±1	10±1	0
<i>B. amyloliquefaciens</i> E8	25±1	20±1*	9±1	15±1	11±1	0
<i>B. amyloliquefaciens</i> E10	0	0	0	0	0	0
<i>B. pumilus</i> E11	35±2	25±1*	32±2	20±1	33±2	н/д

Примітки: * — не спостерігали повної відсутності росту, лише його затримку; н/д — не досліджували.

Отримані дані свідчать про значну різноманітність антагоністичної активності досліджуваних ендofітів. *B. pumilus* E11 продемонстрував найвищу антагоністичну активність проти більшості колекційних штамів фітопатогенів, утворюючи найбільші зони затримки росту щодо *P. syringae* (35±2 мм), *X. campestris* (32±2 мм), *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (33±2 мм) та *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (20±1 мм). *B. amyloliquefaciens* E7 також виявив виражену антагоністичну дію проти *P. syringae* та *X. campestris* (зони затримки росту — 30±2 мм для обох фітопатогенів), а також помірну активність проти *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (15±1 мм) та *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (10±1 мм).

B. amyloliquefaciens E8 характеризувався середнім рівнем антагоністичної активності, з найбільшою ефективністю проти *P. syringae* (25±1 мм) та *P. fluorescens* (20±1 мм). Слід зазначити, що у випадку з *P. fluorescens* для *B. amyloliquefaciens* E7, *B. amyloliquefaciens* E8 та *B. pumilus* E11 спостерігали лише пригнічення росту, але не повну його відсутність, що вказує на бактеріостатичну, а не бактерицидну дію.

Особливий інтерес викликає *B. amyloliquefaciens* E10, який не виявив антагоністичної активності щодо жодного з тестованих фітопатогенів. Це може свідчити про відсутність у цього штаму здатності продукувати антимікробні сполуки, ефективність проти досліджуваних фітопатогенів або про наявність інших механізмів взаємодії з рослиною-хазяїном.

Жоден з досліджених штамів не проявив антагоністичної активності щодо *A. tumefaciens*, що може вказувати на резистентність цього фітопатогена до антимікробних сполук, які продукуються досліджуваними ендofітами.

Отримані результати підтвердили значний потенціал як агентів біоконтролю ендofітних бактерій, виділених з насіння сосни звичайної, особливо *B. amyloliquefaciens* E7, *B. amyloliquefaciens* E8 та *B. pumilus* E11, які можуть бути перспективними для подальшого вивчення як потенційні агенти біологічного контролю фітопатогенних бактерій.

Отже, морфолого-культуральна характеристика ізолятів (E7-E12) із насіння сосни звичайної підтвердила їхню приналежність до роду *Bacillus*. Виділені бактерії формували непрозорі колонії без пігменту із зморшкуватою поверхнею, що характерно для представників цього роду. Ізоляти є грампозитивними паличками, здатними до утворення еліпсоїдних спор, що є типовою ознакою бактерій роду *Bacillus*. Цікавим спостереженням є здатність досліджуваних ізолятів до слабого росту в анаеробних умовах, що відповідає літературним даним для *B. amyloliquefaciens* (De Vos та ін., 2009; Priest, Goodfellow, Shute, & Berkeley, 1987; Ngalimat та ін., 2021). Під час аналізу результатів MALDI-TOF мас-спектрометрії визначено, що серед досліджених ізолятів домінував вид *B. amyloliquefaciens* (80%), також виявлено частку *B. pumilus*, що становить 20%. Висока точність ідентифікації (99,9% для більшості ізолятів) свідчить про надійність отриманих результатів таксономічного аналізу.

Домінування *B. amyloliquefaciens* серед ендofітних бактерій насіння сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) узгоджується з дослідженнями (Reva, Dixelius, Meijer, & Priest, 2004) щодо високої колонізаційної здатності цього виду. Автори зазначають, що *B. amyloliquefaciens* колонізують різні частини рослин, включаючи на-

сіння, та здатні формувати ефективні ендofітні асоціації. Ця характеристика пов'язана з продукуванням специфічних метаболітів і наявністю специфічних генів, що кодують ферменти, білки і системи хемотаксису.

Виявлена антагоністична активність *B. amyloliquifaciens* E7, *B. amyloliquifaciens* E8 та *B. pumilus* E11 проти низки фітопатогенних бактерій становить особливий інтерес. Зокрема, високі показники інгібування росту *P. syringae* (до 35 ± 2 мм), *X. campestris* (до 32 ± 2 мм) та *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (до 33 ± 2 мм) свідчать про значний біоконтрольний потенціал цих ендofітів. Згідно з дослідженням (Reva, Dixelius, Meijer, & Priest, 2004) *B. amyloliquifaciens* та споріднені види здатні продукувати широкий спектр антимікробних сполук, що обумовлює їх антагоністичну дію проти фітопатогенів. Автори також підкреслюють варіювання антимікробної активності серед різних штамів одного виду, що пояснює відмінності в антагоністичному потенціалі досліджуваних ізолятів: відсутність інгібуючої активності у штаму E10.

Важливо зазначити, що жоден з досліджених ізолятів не проявив антагоністичної активності щодо *A. tumefaciens*. Це може бути пов'язано з наявністю у цього фітопатогена специфічних механізмів резистентності до антимікробних сполук, що продукуються ендofітними *Bacillus* spp.

Результати наших досліджень разом із літературними даними підтверджують важливу екологічну роль ендofітних бактерій роду *Bacillus* у формуванні природних захисних механізмів рослин. Висока антагоністична активність ендofітів проти широкого спектра фітопатогенних бактерій вказує на їхній значний біоконтрольний потенціал. Дослідники (Reva, Dixelius, Meijer, & Priest, 2004) зазначали, що здатність бактерій *B. amyloliquifaciens* колонізувати рослинні тканини та продукувати біологічно активні метаболіти робить їх перспективними кандидатами для розробки біопрепаратів для захисту рослин від патогенів.

Наявність ендofітних бактерій роду *Bacillus* у насінні сосни звичайної може відігравати важливу роль у захисті насіння від патогенів під час проростання та сприяти початковому розвитку сянців. Це узгоджується з дослідженнями (Reva, Dixelius, Meijer, & Priest, 2004), які показали, що колонізація насіння представниками *B. amyloliquifaciens* стимулює ріст рослини-хазяїна.

Отже, виділені ендofітні бактерії насіння сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.), ідентифіковані як *B. amyloliquifaciens* та *B. pumilus*, характеризуються значним біотехнологічним потенціалом щодо розробки нових препаратів для контролю фітопатогенів і стимуляції росту рослин. Подальші дослідження мають бути спрямовані на вивчення механізмів взаємодії ендofітних бактерій з тканинами рослини-хазяїна, ідентифікацію біологічно активних метаболітів та оцінку ефективності виділених ізолятів в умовах практичного застосування.

Висновки

Отже, виділені ендofітні бактерії насіння сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.), ідентифіковані як *B. amyloliquifaciens* та *B. pumilus*, характеризуються значним біотехнологічним потенціалом щодо розробки нових препаратів для контролю фітопатогенів та стимуляції росту рослин. Подальші дослідження мають бути спря-

мовані на вивчення механізмів взаємодії ендоефітних бактерій з тканинами рослини-хазяїна, ідентифікацію біологічно активних метаболітів та оцінку ефективності виділених ізолятів в умовах практичного застосування.

Література

- Гвоздяк, Р. І., Кабашна, Л. В., Пасічник, Л. А., & Макарчук С. А. (2001). Ендоефітна мікрофлора зерна пшениці та її взаємодія з фітопатогенними бактеріями. *Доповіді НАНУ*, 1, 173—177.
- Гордієнко, М. І., & Гордієнко, Н. М. (2005). Лісівничі властивості деревних порід. Київ: ТОВ Вістка.
- Грабова, Г. Ю., Драгавоз, І. В., Зелена, Л. Б., Остапчук, А. М., & Авдєєва, Л. В. (2016). Поліфазний таксономічний аналіз штаму *Bacillus* sp. С6 — антагоніста фітопатогенних мікроорганізмів. *Цитологія і генетика*, 50(4), 62—68. doi: <https://www.doi.org/10.3103/S0095452716040046>.
- Мажула, О. С., & Дишко, В. А. (2014). Мінливість штучних і природних популяцій сосни звичайної за біометричними показниками. *Лісівництво і агролісомеліорація*, 125, 122—128.
- Патика, В. П., Пасічник, Л. А., Данкевич, Л. А., Мороз, С. М., Буценко, Л. М., Житкевич, Н. В., ..., Алексеєв, О. О. (2014). Діагностика фітопатогенних бактерій. Методичні рекомендації. Київ: ТОВ Компринт.
- Патика, В. П., Пасічник, Л. А., Гвоздяк, Р. І., Петриченко, В. Ф., Корнійчук, О. В., Буценко, Л. М., ..., Томашук, О. В. (2017). *Фітопатогенні бактерії. Методи досліджень*. Вінниця: ТОВ Віндрук.
- Романовська, В. А., Рокитко, П. В., Шилин, С. О., & Малащенко, Ю. Р. (2003). Актуальні проблеми філогенетичної класифікації бактерій. *Мікробіологічний журнал*, 65(5), 46—66.
- Сірук, Ю. В. (2010). Характеристика лісовідновного процесу на штучно відновлених зрубках у свіжих та вологих суборах центрального полісся. *Науковий вісник НЛТУ України*, 20(6), 57—64.
- Bolivar-Anillo, H. J., González-Rodríguez, V. E., Cantoral, J. M., García-Sánchez, D., Collado, I. G., & Garrido, C. (2021). Endophytic Bacteria *Bacillus subtilis*, Isolated from *Zea mays*, as Potential Bio-control Agent against *Botrytis cinerea*. *Biology*, 10(6), 492. <https://doi.org/10.3390/biology10060492>.
- Borodai, V. V., Kolomiets, Y. V., Likhanov, A. F., Zelena, L. B., Butsenko, L. M., Shemetun, K. I., ..., & Blume, Y. B. (2022). The Growth-promoting and Antipathogenic Effects of Microorganisms Isolated from *Solanum nigrum* L. and Inoculated in *Solanum lycopersicum* L. *The Open Agriculture Journal*, 16(1). <https://doi.org/10.2174/18743315-v16-e2208180>.
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of advanced research*, 19, 29—37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>.
- De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., ..., Whitman, W. B. (Eds.). (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Edition, 3, 1450. <https://doi.org/10.1007/b92997>.
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., ..., & Sessitsch, A. (2015). The hidden world of plant-microbe interactions. *Annual review of phytopathology*, 53, 403—428. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00050-14>.
- Knight, B. C. J. G., & Proom, H. (1950). A comparative survey of the nutrition and physiology of mesophilic species in the genus *Bacillus*. *Journal of General Microbiology*, 4(3), 508. <https://doi.org/10.1099/00221287-4-3-508>.
- Logan, N. A., & De Vos, P. (2015). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust. 164 <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530>.
- Mellmann, A., Cloud, J., Maier, T., Keckevoet, U., Ramminger, I., Iwen, P., ..., & Harmsen, D. (2008). Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), 1946—1954. <https://doi.org/10.1128/JCM.00157-08>.
- Ngalimat, M. S., Yahaya, R. S. R., Baharudin, M. M. A., Yaminudin, S. M., Karim, M., Ahmad, S. A., & Sabri, S. (2021). A review on the biotechnological applications of the operational group *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microorganisms*, 9(3), 614. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030614>.

Pirttilä, A. M., & Frank, A. C. (2011). *Endophytes of forest trees: Biology and applications*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1599-8>.

Priest, F. G., Goodfellow, M., Shute, L. A., & Berkeley, R. C. W. (1987). *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(1), 69—71. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-1-69>.

Priest, F. G., Goodfellow, M., & Todd, C. (1988). A numerical classification of the genus *Bacillus*. *Journal of General Microbiology*, 134(7), 1847—1882. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-7-1847>.

Reva, O. N., Dixelius, C., Meijer, J., & Priest, F. G. (2004). Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(2), 249—259. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.02.003>.

Reva, O. N., Smirnov, V. V., Pettersson, B., & Priest, F. G. (2002). *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(1), 101—107. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-1-101>.

Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(8), 827—837. <https://doi.org/10.1094/mpmi-19-0827>.

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, 183, 92—99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>.

Tsuchida, S., Hiroshi, U., & Tomohiro, N. (2020). Current status of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology. *Molecules*, 25(20), 4775. <https://doi.org/10.3390/molecules25204775>.

White, J. F., Kingsley, K. L., Zhang, Q., Verma, R., Obi, N., Dvinskikh, S., ..., & Kowalski, K. P. (2019). Endophytic microbes and their potential applications in crop management. *Plant and Soil*, 422(1—2), 1—15. <https://doi.org/10.1002/ps.5527>.