Пастощук А., Шустик Д., Зелена П., Юмина Ю., Сківка Л.

УДК 579.64; 579.264

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ *PAENIBACILLUS POLYMYXA*, ВИДІЛЕНИХ З ЕНДОФІТНОГО УГРУПОВАННЯ ЗЕРНА ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ

А. ПАСТОЩУК, аспірант
Д. ШУСТИК, студент
П. ЗЕЛЕНА, завідувач навчальної лабораторії мікробіології та імунології
Ю. ЮМИНА, кандидат біологічних наук, асистент
Л. СКІВКА, доктор біологічних наук, професор
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
E-mail: kotsyuk93@ukr.net; dasashustik@gmail.com; verdipav@ukr.net; juliayumyna@ukr.net; rom1996@knu.ua

https://doi.org/

Анотація. *У попередніх дослідженнях зі складу культурабельного бактеріального ендофітного угруповання зерна пшениці озимої сорту вітчизняної селекції Подолянка з підвищеною стійкістю до збудника базального бактеріозу зернових культур Pseudomonas syringae pv. atrofaciens було виділено штам Paenibacillus polymyxa P6 зі множинними рістстимулювальними властивостями (здатністю до солюбілізації фосфатів, олігонітротрофії та продукції гетероауксинів) та антагоністичною активністю щодо фітопатогенних псевдомонад. Метою цієї роботи було дослідження антимікробної дії екзометаболітів виділеного штаму щодо грамнегативних фітопатогенних мікроорганізмів методом відтермінованого антагонізму за умов культивування бактерії-антагоніста до висіву тест-культур упродовж 72 та 120 год. Як тест-культури використовували мікроорганізми, що зберігаються в колекції Інституту мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України: Ralstonia solanocearum B-1109, Pectobacterium carotovora subsp. carotovora B-1077, Pseudomonas syringae pv. syringae B-1022, Pseudomonas syringae pv. syringae van Hall 1902 B-1027, Pseudomonas syringae pv. atrofaciens B-1011, Pseudomonas syringae pv. atrofaciens B-1013, а також Erwinia amylovora ATCC 15580. Встановлено, що екзометаболіти Paenibacillus polymyxa P6 чинять додозалежну антимікробну дію щодо всіх досліджених фітопатогенних мікроорганізмів. Найбільш виразний інгібівний ефект зареєстровано щодо Erwinia amylovora ATCC 15580, Pseudomonas syringae pv. syringae B-1022 та Ralstonia solanocearum B-1109: діаметр зони відсутності росту за умов дії екзометаболітів, продукованих упродовж 120 год, складає 25,72 ± 4,0 мм, 22,93 ± 2,0 мм та 20,30 ± 4,0 відповідно. Отримані результати обґрунтовують доцільність подальшого вивчення складу і біологічної активності досліджуваних екзометаболітів у перспективі розробки на їх основі біотехнологічних препаратів.*

Ключові слова: *фітопатогени, Paenibacillus polymyxa, ендофіт, екзометаболіти, антимікробна дія*

Актуальність. Внутрішні тканини рослини злакових культур, у тому числі пшениці, колонізовані великим різноманіттям ендофітних бактерій (облігатних або факультативних симбіотичних мікроорганізмів, які не викликають захворювань рослини-хазяїна), що належать до різних родів, таких як *Bacillus, Acinetobacter, Erwinia, Arthrobacter, Achromobacter, Enterobacter, Paenibacillus, Pantoea* тощо [1,2]. Симбіотичні мікроорганізми рослин, у т.ч. й ендофінті симбіонти, представляють значний інтерес із погляду їх використання в агробіотехнології для сталого сільського господарства [3,4]. Ендофітні бактерії чинять сприятливий вплив на рослину-господаря за допомогою різних прямих і непрямих механізмів. Прямі механізми включають продукцію фітогормонів, солюбілізацію фосфатів, фіксацію азоту, поглинання заліза тощо [5]. Крім того, ендофітні мікроорганізми можуть чинити прямий антагоністичний вплив на фітопатогени шляхом конкурування за джерела живлення, а також шляхом синтезу й секреції інгібіторних біологічно активних медіаторів [6]. Аналіз метаболому ендофітних мікроорганізмів диких та культурних рослин виявив, зокрема, що найпоширеніші представники ендофітних угруповань, що належать до родів *Actinobacteria* та *Bacillus,* виробляють ароматичні сполуки, ліпопептиди, рослинні гормони, полісахариди та ферменти, пов'язані з метаболізмом фенілпропаноїдів (який служить багатим джерелом метаболітів у рослинах, необхідний для біосинтезу лігніну і є відправною точкою для синтезу багатьох інших важливих сполук, таких як флавоноїди, кумарини та лігнани), таким чином представляючи високий потенціал для рістстимулювальних стратегій управління посівами сільськогосподарських культур. Крім того, було показано, що численні ендофітні мікроорганізми виробляють вторинні метаболіти з протимікробною та антифунгальною активністю [7]. Зокрема, бактерії роду *Bacillus* є продуцентами лантибіотиків [8], сурфактину, фенгіцину, ітурину [9] та інших антимікробних сполук.

У світі відомий цілий ряд ендофітних штамів, що використовуються для біоконтролю та стимуляції росту і розвитку рослин у формі агробіотехнологічних препаратів. Вони призначені для широкого кола сільськогосподарських культур та застосовуються для прискорення проростання насіння, стимуляції росту рослин, захисту від захворювань різної етіології, підвищення врожайності, покращення якості продукції, а також мінімізації жорстокого впливу хімічних препаратів. Крім того,

ендофітні бактерії здатні успадковуватися з покоління в покоління, зберігаючись у рослинних тканинах [10,11]. Цей факт може дозволити створити ефективні біологічні препарати пролонгованої дії на основі ендофітних бактерій для органічного землеробства.

У попередніх дослідженнях з ендофітного угруповання зерна пшениці озимої сорту вітчизняної селекції Подолянка, для якого було зареєстровано високу стійкість до ураження основним збудником бактеріозів зернових культур *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, нами було виділено грампозитивну спороутворювальну бацилу (ізолят Р6) зі множинними рістстимулювальними властивостями та здатністю до антагоністичної активності проти фітопатогенних псевдомонад. Методами біохімічного та мас-спектрометричного профілювання, а також методом секвенування фрагмента гену 16S рибосомальної РНК цей ізолят було ідентифіковано як *Paenibacillus polymyxa* [12]. Метою цієї роботи було дослідження антмікробної активності метаболітів виділеного ендофітного мікроорганізму щодо низки фітопатогенних бактерій.

Матеріали і методи досліджень. Штам Р6 (*Paenibacillus polymyxa)* зернового ендофітного угруповання пшениці озимої сорту Подолянка культивували за 35°С на агаризованому поживному середовищі картопляний агар (КА): . Антагоністичну активність досліджували методом відтермінованого антагонізму [13,16]. Для цього добову культуру-антагоніст висівали бляшкою у центр чашки Петрі з КА та інкубували впродовж 3 та 5 діб. Через 72 (3 доби) або120 (5 діб) год до колонії, що виросла, радіальним штрихом підсівали тест-культури із бактеріальної суспензії з концентрацією клітин $1,5x10^8$. Для оцінки антагоністичної активності вимірювали зони відсутності росту тест-культур навколо колонії антагоніста. Ступінь антагоністичної активності вважали високим у випадку діаметра зони відсутності росту тест культури ≥ 15-30 мм, середнім - ≥ 8-15 мм і слабким - ≥ 3-5 мм [17]. Як тест-культури використовували штами мікроорганізмів, отримані з Української колекції мікроорганізмів (УКМ) Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАНУ. До переліку тест-культур входили фітопатогенні бактерії *Ralstonia solanocearum* B-1109, *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* B-1077, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B-1022, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902 B-1027, *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* B-1011, *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* B-1013, а також *Erwinia amylovora* ATCC 15580. Тестові мікроорганізми

культивували на КА за температури 28°С. Як контроль, тестові мікроорганізми культивували у відсутності мікроорганізма-антагоніста.

Всі досліди проводили у шести повторах. Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням програми Microsoft Excel. Для множинного порівняння показників діаметру зони відсутності росту тестових мікроорганізмів застосовували дисперсійний аналіз Anova з апостеріорним критерієм Тьюки та поправкою Бонферроні для контролю ймовірності групової помилки та мінімізації похибки методу. Статистично достовірними вважали відмінності між показниками за $p \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. За даними Міжнародного союзу охорони природи та природних ресурсів у світі зареєстровано біля 300 тис видів рослин [18]. З них лише у ~10% видів досліджено ендофітні мікробні угруповання [7]. За результатами цих досліджень встановлено, що ендофітні мікроорганізми впливають на фізіологію та розвиток рослин. Зокрема грампозитивні ендофітні бактерії мають важливе значення у процесах біоремедіації, біоконтролю, росту рослин, симбіотично-мутуалістичних, коменсальних, трофобіотичних взаємодіях, контролі ґрунтових патогенів та підтримці захисту рослин-господарів від стресових чинників навколишнього середовища [19]. Ендофітні мікроорганізми – джерело широкого спектру вторинних метаболітів, які знаходять застосування не лише у сільському господарстві, а й у фармацевтичній та промисловій мікробіотехнології. Деякі вторинні метаболіти, продуковані ендофітними симбіонтами, діють як антимікробні агенти проти патогенів людини тварин і рослин [20]. Найбільш поширеними грампозитивними ендофітними мікроорганізмами, що продукують широкий спектр біологічно активних вторинних метаболітів, є представники родів *Bacillus* і *Streptomyces* [7].

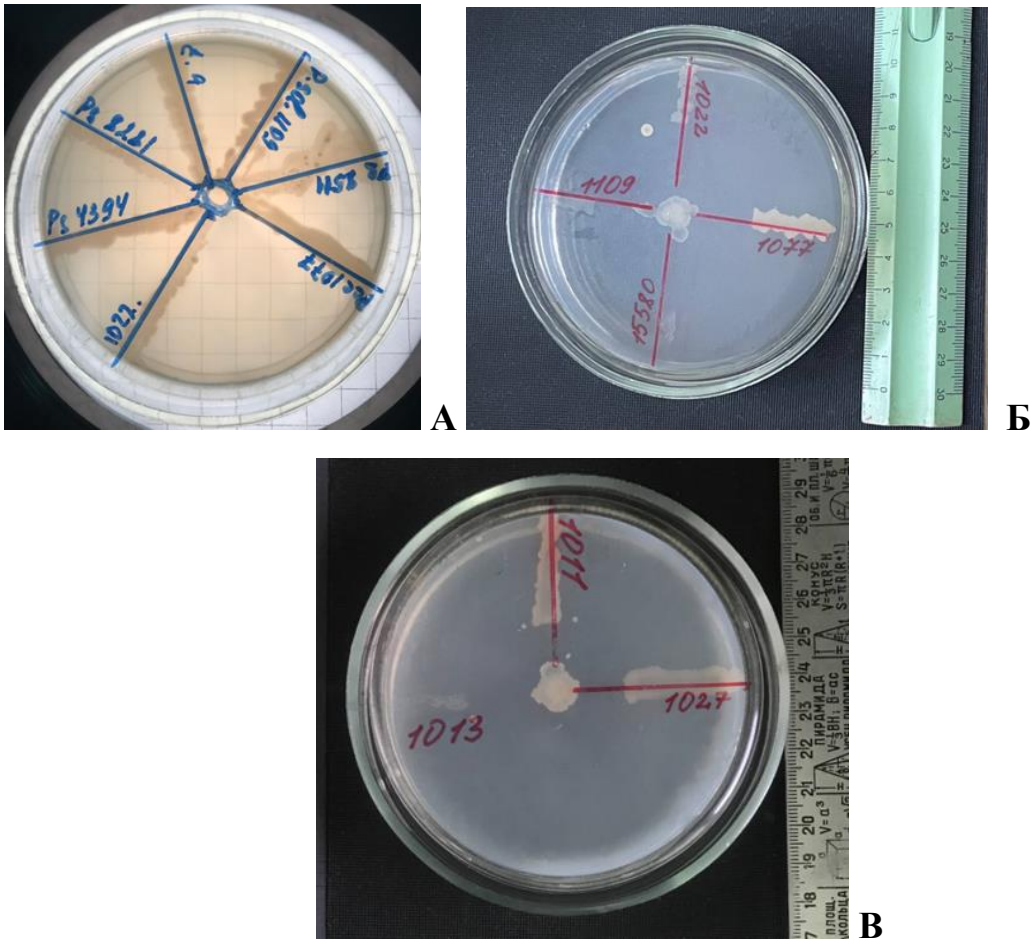
Paenibacillus polymyxa P6, виділена нами із зернового ендофіту пшениці озимої з підвищеною стійкістю до *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* та ідентифікована із застосуванням біохімічного, мас-спектрометричного та молекулярно-генетичного методів, володіє здатністю до солюбілізації фосфатів, олігонітротрофії та синтезу гетероауксинів. Крім того, методом дифузії з агарових лунок нами було зареєстровано антагоністичну активність цього штаму щодо збудника базального бактеріозу зернових культур [12]. Згідно літературних даних, саме ендофіти зерна становлять особливий інтерес з точки зору їх використання в агробіотехнології через їх унікальні

властивості, які включають здатність вертикальної передачі між поколіннями, регуляторну роль у процесі колонізації симбіотичною мікробіотою інших тканин рослини та здатність зберігати біологічні властивості впродовж тривалого перебування у стані спокою, пов'язаному зі зберіганням посівного матеріалу [21]. З огляду на це ми вважали поглиблене вивчення антагоністичних властивостей виділеного ендофітного мікроорганізму важливим у перспективі розробки на його основі агробіотехнологічногло препарату. Дослідження проводили методом відтермінованого антагонізму. Серед усіх методів дослідження антагоністичної активності мікроорганізмів саме цей метод, заснований на роздільному послідовному культивуванні тестованих та індикаторних культур, дозволяє виявити продуковані антагоністом екзометаболіти, які пригнічують ріст інших мікроорганізмів. Зважаючи на те, що біологічна дія антимікробних сполук має дозозалежний характер, а кінетика синтезу різних екзометаболітів мікроорганізмом-антагоністом може мати різні часові рамки, підсів тест-культур проводили у різні часові точки періоду культивування *P. polymyxa* P6: через 72 год та через 120 год від початку. Як показали результати досліджень, екзометаболіти *P. polymyxa* P6 у концентрації, синтезованій впродовж 72 год, чинили порівняну середню (помірну) антимікробну дію щодо всіх тест-культур фітопатогенних бактерій (рис.1, таблиця 1).

Антибактеріальна дія екзометаболітів *P. polymyxa* P6 у концентрації, синтезованій упродовж 120 год, різнилася щодо різних фітопатогенів.

Erwinia amylovora – збудник бактеріальної опікової хвороби (*Erwinia amylovora* ATCC 15580 – типовий штам, виділений R. Lelliot із груші в 1959 р), яка спричиняє серйозні втрати врожаю плодів розоцвітних рослин. Застосування антибіотиків, особливо стрептоміцину сульфату, є найбільш ефективною стратегією боротьби з цим захворюванням. Однак, за останні роки зареєстровано численні ізоляти цього фітопатогену зі стійкістю до стрептоміцину [22]. За результатами наших досліджень екзометаболіти *P. polymyxa* P6 у концентрації, синтезованій упродовж 120 год, чинили найбільш виразний інгібівний вплив на ріст цього фітопатогену. Отримані нами дані узгоджуються з даними Dagher et al., 2020 [23], згідно з якими метаболіти *P. polymyxa*, виділених з епіфіту листя і плодів томатів, характеризувалися високим рівнем антагоністичної активності щодо збудника бактеріального опіку. Водночас автори повідомляють про низьку стійкість біологічної

активності цих екзометаболітів за тривалого зберігання. Arab et al., 2020 зареєстрували потужну інгібовану дію екзометаболітів *P. polymyxa*, виділених з ендофіту коренів яб луні, щодо *E. amylovora* [24].



А **Б** **В**

Рис. 1. Репрезентативні ілюстрації антимікробної дії екзометаболітів *P. polymyxa* P6, продукованих у середовище культивування впродовж 120 год, щодо фітопатогенних мікроорганізмів. А – контроль, Б і В – дослідні зразки.

Примітки: 1109 - *Ralstonia solanocearum* B-1109; 1022 - *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B-1022; 1077 - *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* B-1077; 11580 - *Erwinia amylovora* ATCC 15580; 1013 - *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* B-1013; 1011 - *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* B-1011; 1027 - *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902 B-1027.

Інгібований вплив високого рівня з боку екзометаболітів *P. polymyxa* P6 у концентрації, синтезованій упродовж 120 год, зареєстровано нами також щодо *Ralstonia solanocearum*, яка посідає друге місце поміж фітопатогенних бактерій з найвищим руйнівним потенціалом: щорічні світові економічні збитки через втрату врожаїв сільськогосподарських культур, спричинених цим мікроорганізмом оцінюються у більше, ніж мільйон доларів США. *R.*

solanocearum спричиняє захворювання, відоме під назвою бактеріального в'янення, і уражує понад 250 рослин-господарів у 54 родинах, поміж яких основні культури (картопля), плодові культури (банани, томати), олійні культури (соняшник, арахіс), пряні та кормові культури, лісові дерева, бур'яни та багато декоративних рослин. Крім широкого спектру рослин-хазяїв, унікальними властивостями цього фітопатогену є його агресивність у різноманітних умовах середовища та здатність зберігати гени патогенності за відсутності рослини-хазяїна [25]. Наші дані щодо високого рівня інгібівної активності екзометаболітів *P. polymyxa* P6 щодо цього фітопатогену узгоджуються з даними літератури, згідно з якими антагоністичний ефект зареєстровано для ізолятів *P. polymyxa*, виділених з епіфіту солодкого перцю (*Capsicum annum*) [26], а також для ендофітних бактерій роду *Bacillus*, виділених з арахісу [27]. Однак, повідомлення про цілеспрямоване дослідження антагоністичної активності екзометаболітів цих антагоністів у зазначених літературних джерелах відсутні.

1. Антагоністична активність бактерій штаму *Paenibacillus polymyxa* P6 щодо фітопатогенних бактерій

Тестовий мікроорганізм	Зона відсутності росту, 3 доба, мм (M±SD)	Зона відсутності росту, 5 доба, мм (M±SD)
Ralstonia solanocearum B - 1109 (УКМ)	7,19 ± 0,5	20,30 ± 4,0[a]
Pectobacterium carotovora subsp. *carotovora* B - 1077 (УКМ)	7,41 ± 1,0	19,26 ± 2,0[a]
Pseudomonas syringae pv. *syringae* B - 1022 (УКМ)	6,32 ± 1,0	22,93 ± 2,0[a]
Pseudomonas syringae pv. *syringae* van Hall 1902 B-1027 (УКМ)	6,46 ± 1,0	12,33 ± 1,0[b]
Pseudomonas syringae pv. *atrofaciens* B - 1011 (УКМ)	5,93 ± 1,5	10,82 ± 2,0[b]
Pseudomonas syringae pv. *atrofaciens* B - 1013 (УКМ)	6,93 ± 2,0	17,57 ± 3,0[a]
Erwinia amylovora ATCC 15580	7,42 ± 1,5	25,72 ± 4,0[a]

Примітка: різними літерами позначено статистично достовірні відмінності між варіантами досліду ($p \leq 0,05$).

Доволі високий рівень інгібівної активності екзометаболітів *P. polymyxa* P6, виділених у середовище культивування впродовж 120 год, зареєстровано щодо *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, яка спричиняє м'яку гниль різних рослин-господарів та чорну ніжку у картоплі внаслідок деградації клітинної стінки рослини, завдаючи значних економічних збитків в агропромислових секторах усіх країн

світу. Ефективні хімічні засоби боротьби з цими хворобами відсутні, оскільки здатність бактерицидних сполук знезаражувати насіннєві бульби обмежена. Методом запобігання інфекції є використання насіннєвих бульб, отриманих із матеріалу, не забрудненого *Pectobacterium* sp. З огляду на вище зазначене, біологічні засоби контролю цього фітопатогену розглядаються, як єдина ефективна альтернатива застосуванню хімічних чинників [28]. Пошук засобів біоконтролю проводиться й серед ендофітних мікроорганізмів, насамперед, рослин картоплі. Встановлено, зокрема, ефективний антагонізм щодо цього фітопатогенну з боку ендофітних актинобактерій картоплі [29]. Літературні дані щодо ендофітних бацил з антагоністичною активністю щодо цього фітопатогенну нами не були знайдені.

Рівень антимікробної активності екзометаболітів *P. polymyxa* P6 у концентрації, синтезованій упродовж 120 год, щодо фітопатогенних псевдомонад значно різнився залежно від патовару мікроорганізму. Комплекс *Pseudomonas syringae*, до складу якого входять використані нами патовари, включає різні генетичні групи, котрі, у свою чергу, включають штами, виділені з сільськогосподарських і диких рослин. Описано понад 50 патоварів *P. syringae*, які у сукупності вражають майже всі економічно важливі види сільськогосподарських культур, що робить цей фітопатоген одним з найпоширеніших. *P. syringae* pv. *syringae* B - 1022 та *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902 B-1027, які спричиняють апікальний опік рослин, є найбільш поліфаговими бактеріями у комплексі *P. syringae* з широким спектром господарів [30,31]. Серед усіх фітопатогенних псевдомонад, використаних нами як тестові мікроорганізми, до патовару B – 1022 виявлено найвищий рівень інгібівної дії з боку екзометаболітів досліджуваного ендофітного мікроорганізму. Інгібіторна дія щодо інших патоварів цього фітопатогенну була більш помірною.

Факультативно-анаеробна *Paenibacillus* є рухомою бактерією, що утворює ендоспори. Раніше *Paenibacillus* була ідентифікована в межах роду *Bacillus*. Однак, після розробки методів молекулярної ідентифікації, у 1993 році вона була виділена як окремий рід, який нині належить до родини *Paenibacillaceae*. Різні види є грам-варіабельними, оскільки вони можуть бути як грампозитивними, так і грамнегативними. Продукція антимікробних речовин різниться між видами через різноманітність генів, що кодують ці сполуки. Антимікробні чинники, продуковані бактеріями роду *Paenibacillus*, включають пептиди, леткі органічні

сполуки та ферменти. Останні чинять потужну протигрибкову дію і включають протеази, целюлази, глюканази та хітинази. Бактерії цього роду виробляють антимікробні пептиди двох типів: нерибосомно синтезовані пептиди і рибосомно-синтезовані бактеріоцини. Відомо, що *Paenibacillus* виробляє два з трьох класів бактеріоцинів, деякі види виробляють поліміксини [32]. Згідно даних Hong et al., 2016 [33], *P. polymyxa*, виділена з ризосфери арабідопсису, чинить антагоністичну дію проти кількох патоварів фітопатогенних псевдомонад. Є повідомлення щодо антагоністичної активності *P. polymyxa*, виділених з ендофіту кукурудзи, щодо фітопатогенних грибів [34]. Отриманий нами *P. polymyxa* P6 найбільш подібний за біологічними властивостями (солюбілізація фосфатів, олігонітротрофія, синтез гетероауксинів, широкоспектровий антагонізм) до *Paenibacillus polymyxa* E681, виділеного з кореневого ендофіту ячменю у Південній Кореї в 1995 році. Мікробіотехнологічний потенціал цього штаму був нещодавно розширений після детального дослідження його геному. Було виявлено щонайменше шість кластерів генів для біосинтезу антибіотиків, у т.ч. поліміксину. Три групи антибіотичних синтаз включають кластери генів, які кодують ферменти, залучені до синтезу нерибосомного пептиду поліміксину, фузарицидину і тридекаптину, лантибіотика панілану і полікетиду [35]. Зважаючи на значну варіабельність у спектрі антимікробних сполук серед штамів *P. polymyxa*, не виключена можливість унікального профілю продукованих екзометаболітів з антимікробною активністю у виділеного нами ендофітного мікроорганізму.

Висновки та перспективи. Отже, штам *P. polymyxa* P6, виділений із зернового ендофіту сорту пшениці озимої вітчизняної селекції Подолянка, стійкого до основного збудника базального бактеріозу зернових культур *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, продукує екзометаболіти з антимікробною активністю щодо фітопатогенних грамнегативних бактерій, у т.ч. збудників інфекційних захворювань основних сільськогосподарських культур, які завдають значних економічних збитків агропромисловому виробництву. Антимікробна дія досліджуваного штаму має дозозалежний характер і залежить від біологічних характеристик фітопатогенного мікроорганізму. Вивчення складу продукованих екзометаболітів з антимікробною активністю потребує додаткових досліджень.

Список використаних джерел

1. Rana K.L., Kour D., Kaur T., Sheikh I., Yadav AN., Kumar V., Suman A., Dhaliwal H. S. Endophytic Microbes from Diverse Wheat Genotypes and Their Potential Biotechnological Applications in Plant Growth Promotion and Nutrient Uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* ,N90. 2020. P.1-11. https://doi.org/10.1007/s40011-020-01168-0.

2. Herrera D., Grossi C., Zawoznik M., Groppa M.D. Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of Fusarium graminearum. *Microbiol. Res.* 2016. N18. P.37–43. https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.03.00

3. Shahzad R., Khan A.L., Bilal S., Asaf S., Lee Y.J. What is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant growth. *Front. Plant Sci*. 2018. N9. P. 24. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00024

4. Shade A., Jacques M.A., Barret M. Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Curr. Opin. Microbiol*. 2017. N37. P.15–22. https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.010.

5. Papik J., Folkmanova M., Polivkova-Majorova M., Suman J., Uhlik O. The invisible life inside plants: Deciphering the riddles of endophytic bacterial diversity. *Biotechnology Advances*. 2020. N44. 107614. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107614.

6. Karthikeyan G., Rajendran L., Sendhilvel V., Prabakar K., Raguchander T. Diversity and functions of secondary metabolites secreted by epi-endophytic microbes and their interaction with phytopathogens/ Biocontrol Agents and Secondary Metabolites. Ed. Sudisha Jogaiah, Woodhead Publishing, Pages. 2021. P. 495-517.

7. Ek-Ramos MJ, Gomez-Flores R, Orozco-Flores AA, Rodríguez-Padilla C, González-Ochoa G and Tamez-Guerra P Bioactive Products From Plant-Endophytic Gram-Positive Bacteria. *Front. Microbiol.* 2019. N10: 463. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00463.

8. Deng Y., Zhu Y., Wang P., Zhu L., Zheng J., Li R., et al. Complete genome sequence of Bacillus subtilis BSn5, an endophytic bacterium of *Amorphophallus konjac* with antimicrobial activity for the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. Carotovora. *J. Bacteriol.* 2011. N193. P.2070–2071. https://doi.org/10.1128/JB.00129-11.

9. Cazorla F. M., Romero D., Pérez-García A., Lugtenberg B. J. J., Vicente A. D., and Bloemberg G. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *J. Appl. Microbiol.* 2007. N103. P.1950–1959. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03433.x.

10. Compant S., Cambon M.C., Vacher C., Mitter B., Samad A., Sessitsch A. The plant endosphere world—Bacterial life within plants. *Environmental Microbiology*. 2020. N23. P.1812–1829. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15240.

11. Kuźniar A., Włodarczyk K., Grządziel J., Woźniak M., Furtak K., Gałązka A., Dziadczyk E., Skórzyńska-Polit E., Wolińska, A. New Insight into the Composition of Wheat Seed Microbiota. *International journal of molecular sciences*. 2020. V.21, N13. 4634. https://doi.org/10.3390/ijms21134634.

12. Pastoshchuk A., Yumyna Y., Zelena P., Nudha V., Yanovska V., Kovalenko M., Taran N., Patyka V., Skivka L. Beneficial traits of grain-resided endophytic communities in wheat with different sensitivity to *Pseudomonas syringae*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2021. V.12, N3. P. 498-505. https://doi.org/10.15421/022168.

13. Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6 издание переработанное/ под ред. Н.С. Егорова. Москва: Издательский дом МГУ, 2004. 528 с.

14. Гужвинська С. О., Палій А. П. Визначення антагоністичних та адгезивних властивостей лактобактерій та біфідобактерій. *Мікробіологічний журнал*. 2018. Т. 80, № 1. С. 36-44. https://doi.org/10.15407/microbiolj80.01.036

15. Eldeen I.M.S. Isolation of 12 bacterial endophytes from some mangrove plants and determination of antimicrobial properties of the isolates and the plant extracts.

International Journal of Phytomedicine.2014. V6. N3. P.425-432.

16. Klein J.M., Stockwell V.O., Minsavage G.V., Vallad G.E., Goss E.M., Jones J.B. Improved deferred antagonism technique for detecting antibiosis. *Lett Appl Microbiol*. 2020.V.71. N4. P.330-336. https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-20-0402-R.

17. Швець М. Асоційовані з *Enterobacter nimipressuralis* бактерії у патології бактеріальної водянки Betula pendula roth. *Науковий вісник. НЛТУ України*. 2017. Т. *27*. №3. С. 66-70.

18. New Approach to Conservation: The Importance of the Individual through Wildlife Rehabilitation/ Ed. G. A. Aitken. London: Routledge, 2004. P.218

19. Dudeja S.S,. Suneja-Madan P., Paul M., Maheswari R., Kothe E. Bacterial endophytes: Molecular interactions with their hosts. *J Basic Microbiol*. 2021. V.61. N6. P.475-505. https://doi.org/10.1101/2022.01.04.474905.

20. Tripathi V. C., Satish S., Horam S., Raj S., Arockiaraj J., Pasupuleti M., et al. Natural products from polar organisms: structural diversity, bioactivities and potential pharmaceutical applications. *Polar Sci*. 2018. N18. P.147–166. https://doi.org/10.1016/j.polar.2018.04.006.

21. Compant S., Cambon M. C., Vacher C., Mitter B., Samad A., Sessitsch A. The plant endosphere world – bacterial life within plants. *Environmental Microbiology*. 2020. N23. P. 1812–1829. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15240.

22. Jimenez Madrid A. M., Klass T., Roman-Reyna V., Jacobs J., Lewis Ivey M. L. Draft Genome Sequences of Four Streptomycin-Sensitive Erwinia amylovora Strains Isolated from Commercial Apple Orchards in Ohio. *Microbiology resource announcements*. 2021. V.10. N50. e0089321. https://doi.org/10.1128/MRA.00893-21.

23. Dagher F., Olishevska S., Philion V., Zheng J., Déziel E. Development of a novel biological control agent targeting the phytopathogen *Erwinia amylovora*. *Heliyon*. 2020. V.6. N10. e05222. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05222.

24. Arab M., Ahani Azari A. Antagonistic potential of rhizospheric and endophytic bacteria against Fire blight, caused by Erwinia amylovora. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology*. 2020. V.10. N2. P.1331-1338.

25. Paudel S., Dobhal S., Alvarez A. M., Arif, M. Taxonomy and Phylogenetic Research on Ralstonia solanacearum Species Complex: A Complex Pathogen with Extraordinary Economic Consequences. *Pathogens (Basel, Switzerland)*.2020. V.9. N11. 886. https://doi.org/10.3390/pathogens9110886.

26. Mamphogoro T.P., Kamutando C.N., Maboko M.M., Aiyegoro O.A., Babalola O.O. Epiphytic Bacteria from Sweet Pepper Antagonistic In Vitro to *Ralstonia solanacearum* BD 261, a Causative Agent of Bacterial Wilt. *Microorganisms*. 2021. V.9. N9. 1947. https://doi.org/10.3390/microorganisms9091947.

27. Wang X, Liang G. Control efficacy of an endophytic Bacillus amyloliquefaciens strain BZ6-1 against peanut bacterial Wilt, *Ralstonia solanacearum*. *Biomed Res Int*. 2014. V.2014. 465435. https://doi.org/10.1155/2014/465435.

28. Wu H.P., Derilo R.C., Chen H.L., Li T.R, Lagitnay RBJS, Chan YC, Chuang Y, Chuang DY. Injectisome T3SS subunits as potential chaperones in the extracellular export of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* bacteriocins Carocin S1 and Carocin S3 secreted via flagellar T3SS. *BMC Microbiol*. 2021. V.21. N1. 345.

29. Padilla-Gálvez N, Luengo-Uribe P, Mancilla S, Maurin A, Torres C, Ruiz P, France A, Acuña I, Urrutia H. Antagonistic activity of endophytic actinobacteria from native potatoes (Solanum tuberosum subsp. tuberosum L.) against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum*. *BMC Microbiol*. 2021. V.21. N1. 335. https://doi.org/10.1186/s12866-021-02393-x.

30. Gutiérrez-Barranquero J.A., Cazorla F.M., de Vicente A. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Associated With Mango Trees, a Particular Pathogen Within the "Hodgepodge" of the *Pseudomonas syringae* Complex. *Front Plant Sci*. 2019.

N10. 570. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00570.

31. Butsenko L.M. Геномодулювальна активність *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* і *P. syringae* pv. *atrofaciens. Біоресурси і природокористування*. 2019. Т.11. № 3-4. С. 25-31. https://doi.org/10.31548/bio2019.03.003.

32. Eltokhy M.A., Saad B.T., Eltayeb W.N., Yahia I.S., Aboshanab K.M., Ashour M.S.E. Exploring the Nature of the Antimicrobial Metabolites Produced by *Paenibacillus ehimensis* Soil Isolate MZ921932 Using a Metagenomic Nanopore Sequencing Coupled with LC-Mass Analysis. *Antibiotics (Basel)*. 2021. V.11. N1. 12. https://doi.org/10.3390/antibiotics1101001.

33. Hong C.E., Kwon S.Y., Park J.M. Biocontrol activity of *Paenibacillus polymyxa* AC-1 against *Pseudomonas syringae* and its interaction with Arabidopsis thaliana. *Microbiol Res*. 2016. N185. P.13-21. https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.01.004

34. Liu Y., Wang R., Cao Y. *et al.* Identification and antagonistic activity of endophytic bacterial strain *Paenibacillus* sp. 5 L8 isolated from the seeds of maize (*Zea mays* L., Jingke 968). *Ann Microbiol.* 2016. N 66. P. 653–660. https://doi.org/10.1007/s13213-015-1150-x.

35. Jeong H, Choi SK, Ryu CM, Park SH. Chronicle of a Soil Bacterium: *Paenibacillus polymyxa* E681 as a Tiny Guardian of Plant and Human Health. *Front Microbiol*. 2019. N10. 467. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00467.

Referenses

1. Rana, KL, Kour D, Kaur T, Sheikh I, Yadav AN, Kumar V, Suman A, Dhaliwal H S. (2020). Endophytic Microbes from Diverse Wheat Genotypes and Their Potential Biotechnological Applications in Plant Growth Promotion and Nutrient Uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.,* 90, 1-11. https://doi.org/10.1007/s40011-020-01168-0.

2. Herrera, D., Grossi, C., Zawoznik, M., Groppa, M.D. (2016) Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of Fusarium graminearum. *Microbiol. Res*. 186, 37–43. https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.03.00

3. Shahzad, R.; Khan, A.L.; Bilal, S.; Asaf, S.; Lee, Y.J. (2018).What is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant growth. Front. Plant Sci., 9, 24. https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.03.00.

4. Shade, A., Jacques, M.A.; Barret, M. (2017). Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Curr. Opin. Microbiol*. 37, 15–22. https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.010.

5. Papik, J., Folkmanova, M., Polivkova-Majorova, M., Suman, J., Uhlik, O. (2020). The invisible life inside plants: Deciphering the riddles of endophytic bacterial diversity. *Biotechnology Advances*, 44, 107614. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107614.

6. Karthikeyan, G., Rajendran, L., Sendhilvel, V., Prabakar, K., Raguchander, T. (2021) 22 - Diversity and functions of secondary metabolites secreted by epi-endophytic microbes and their interaction with phytopathogens, Editor(s): Sudisha Jogaiah, Biocontrol Agents and Secondary Metabolites, Woodhead Publishing, 495-517.

7. Ek-Ramos, M.J., Gomez-Flores, R., Orozco-Flores, A.A., Rodríguez-Padilla, C., González-Ochoa, G., and Tamez-Guerra, P. (2019) Bioactive Products From Plant-Endophytic Gram-Positive Bacteria. *Front. Microbiol.*, 10, 463. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00463.

8. Deng, Y., Zhu, Y., Wang, P., Zhu, L., Zheng, J., Li, R., et al. (2011). Complete genome sequence of Bacillus subtilis BSn5, an endophytic bacterium of *Amorphophallus konjac* with antimicrobial activity for the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. Carotovora. *J. Bacteriol.*, 193, 2070–2071. https://doi.org/10.1128/JB.00129-11.

9. Cazorla, F. M., Romero, D., Pérez-García, A., Lugtenberg, B. J. J., Vicente, A. D., and Bloemberg, G. (2007). Isolation and characterization of antagonistic Bacillus subtilis strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1950–1959.

https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03433.x.

10. Compant, S., Cambon, M.C., Vacher, C., Mitter, B., Samad, A. & Sessitsch, A. (2020) The plant endosphere world—Bacterial life within plants. *Environmental Microbiology*, 23, 1812–1829. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15240.

11. Kuźniar, A., Włodarczyk, K., Grządziel, J., Woźniak, M., Furtak, K., Gałązka, A., Dziadczyk, E., Skórzyńska-Polit, E. & Wolińska, A (2020). New Insight into the Composition of Wheat Seed Microbiota. *International journal of molecular sciences*, 21(13), 4634. https://doi.org/10.3390/ijms21134634.

12. Pastoshchuk, A., Yumyna, Y., P Zelena, Nudha, V., Yanovska V., Kovalenko, M., Taran, N., Patyka V., Skivka, L. (2021). Beneficial traits of grain-resided endophytic communities in wheat with different sensitivity to *Pseudomonas syringae*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*., 12(3), 498-505. https://doi.org/10.15421/022168.

13. Egorov, I.,S. (2004). Fundamentals of the doctrine of antibiotics: Textbook. 6th ed., Reworked. MSU Publishing House; Science, P.528. (in Ukrainian)

14. Guzhvinskaya, S. O. (2018). Determination of antagonistic and adhesive properties of lactobacilli and bifidobacterial. *Mikrobiol. Z*, 80(1),36-44. (in Ukrainian). https://doi.org/10.15407/microbiolj80.01.036.

15. Eldeen, I.,M.,S.(2014). Isolation of 12 bacterial endophytes from some mangrove plants and determination of antimicrobial properties of the isolates and the plant extracts. *International Journal of Phytomedicine*, 6(3), 425-432;

16. Klein JM, Stockwell VO, Minsavage GV, Vallad GE, Goss EM, Jones JB. (2020). Improved deferred antagonism technique for detecting antibiosis. *Lett Appl Microbiol*, 71(4), 330-336. https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-20-0402-R.

17. Shvets, M.,V. (2017). Enterobacter nimipressuralis-associated bacteria in the pathology of bacterial edema Vetula pendula Roth. *Scientific Bulletin of NLTU of Ukraine*. 27 (3), 66-70. (in Ukrainian).

18. Aitken, G. (2004). A New Approach to Conservation: The Importance of the Individual throughWildlife Rehabilitation. London: Routledge, 218 p.

19. Dudeja, S.,S, Suneja-Madan, P., Paul, M., Maheswari, R., Kothe, E. (2021). Bacterial endophytes: Molecular interactions with their hosts. *J Basic Microbiol*., 61(6), 475-505. https://doi.org/10.1101/2022.01.04.474905.

20. Tripathi, V. C., Satish, S., Horam, S., Raj, S., Arockiaraj, J., Pasupuleti, M., et al. (2018). Natural products from polar organisms: structural diversity, bioactivities and potential pharmaceutical applications. *Polar Sci.*, 18, 147–166. https://doi.org/10.1016/j.polar.2018.04.006.

21. Compant, S., Cambon, M. C., Vacher, C., Mitter, B., Samad, A. & Sessitsch, A. (2020) The plant endosphere world – bacterial life within plants. *Environmental Microbiology*, 23, 1812–1829. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15240.

22. Jimenez Madrid, A. M., Klass, T., Roman-Reyna, V., Jacobs, J., & Lewis Ivey, M. L. (2021). Draft Genome Sequences of Four Streptomycin-Sensitive Erwinia amylovora Strains Isolated from Commercial Apple Orchards in Ohio. *Microbiology resource announcements*, 10(50), e0089321. https://doi.org/10.1128/MRA.00893-21.

23. Dagher, F., Olishevska, S., Philion, V., Zheng, J., & Déziel, E. (2020). Development of a novel biological control agent targeting the phytopathogen *Erwinia amylovora*. *Heliyon*, 6(10), e05222. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05222.

24. Arab, M., Ahani Azari, A. (2020). Antagonistic potential of rhizospheric and endophytic bacteria against Fire blight, caused by Erwinia amylovora. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology*, 10(2), 1331-1338.

25. Paudel, S., Dobhal, S., Alvarez, A. M., & Arif, M. (2020). Taxonomy and Phylogenetic Research on Ralstonia solanacearum Species Complex: A Complex Pathogen with Extraordinary Economic Consequences. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(11), 886. https://doi.org/10.3390/pathogens9110886.

26. Mamphogoro, T.,P, Kamutando, C.N., Maboko, M.M., Aiyegoro, O.A., Babalola, O.O. (2021). Epiphytic Bacteria from Sweet Pepper Antagonistic In Vitro to *Ralstonia solanacearum* BD 261, a Causative Agent of Bacterial Wilt. *Microorganisms*, 9(9),1947. https://doi.org/10.3390/microorganisms9091947.

27. Wang, X., Liang, G. (20214). Control efficacy of an endophytic Bacillus amyloliquefaciens strain BZ6-1 against peanut bacterial Wilt, Ralstonia solanacearum. *Biomed Res Int.*, 2014, 465435. https://doi.org/10.1155/2014/465435.

28. Wu, H.P., Derilo, R.C., Chen, H.L., Li, T.R., Chan, Y.C., Chuang, Y., Chuang, D.Y. (2021).Injectisome T3SS subunits as potential chaperones in the extracellular export of Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum bacteriocins Carocin S1 and Carocin S3 secreted via flagellar T3SS. *BMC Microbiol*., 21(1), 345.

29. Padilla-Gálvez, N., Luengo-Uribe, P., Mancilla, S., Maurin, A., Torres, C., Ruiz, P., France, A., Acuña, I., Urrutia, H. (2021). Antagonistic activity of endophytic actinobacteria from native potatoes (Solanum tuberosum subsp. tuberosum L.) against Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum and Pectobacterium atrosepticum. *BMC Microbiol*, 21(1), 335. https://doi.org/10.1186/s12866-021-02393-x.

30. Gutiérrez-Barranquero, J.A., Cazorla, F.M., de Vicente, A. (2019). *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* Associated With Mango Trees, a Particular Pathogen Within the "Hodgepodge" of the *Pseudomonas syringae* Complex. Front Plant Sci, 10:570. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00570.

31. Butsenko, L., M. (2019). Genomodulatory activity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. syringae* pv. *atrofaciens.* Bioresources and nature management.11(3-4), 25-31. (in Ukrainian). https://doi.org/10.31548/bio2019.03.003.

32. Eltokhy, M., A, Saad, B.,T, Eltayeb, W.,N, Yahia, I.,S, Aboshanab, K.,M, Ashour, M.,S.,E. (2021). Exploring the Nature of the Antimicrobial Metabolites Produced by *Paenibacillus ehimensis* Soil Isolate MZ921932 Using a Metagenomic Nanopore Sequencing Coupled with LC-Mass Analysis. *Antibiotics (Basel)*, 11(1), 12. https://doi.org/10.3390/antibiotics11010012.

33. Hong, C., E, Kwon, S., Y, Park, J., M. (2016). Biocontrol activity of *Paenibacillus polymyxa* AC-1 against *Pseudomonas syringae* and its interaction with Arabidopsis thaliana. *Microbiol Res*., 185, 13-21. https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.01.004

34. Liu, Y., Wang, R., Cao, Y. *et al.* (2016). Identification and antagonistic activity of endophytic bacterial strain *Paenibacillus* sp. 5 L8 isolated from the seeds of maize (*Zea mays* L., Jingke 968). *Ann Microbiol.*, 66**,** 653–660. https://doi.org/10.1007/s13213-015-1150-x.

35. Jeong, H., Choi, S.,K, Ryu, C.,M, Park, S.,H. (2019). Chronicle of a Soil Bacterium: *Paenibacillus polymyxa* E681 as a Tiny Guardian of Plant and Human Health. *Front Microbiol.* 10, 467. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00467

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXOMETABOLITES OF *PAENIBACILLUS POLYMYXA*, ISOLATED FROM ENDOPHYTIC COMMUNITY OF WINTER WHEAT GRAIN

A. Pastoshchuk, D. Shustyk, P. Zelena, Yu. Yumyna, L. Skivka

Abstract. *In preliminary studies, a strain Paenibacillus polymyxa P6 possessing multiple plant growth-promoting (phosphate solubilization, oligonitrotrophy and production of heteroauxins) and antagonistic activities was isolated from grain-resided cultivable bacterial endophytic community of winter wheat variety of the domestic selection Podolyanka with increased resistance to the causative agent of basal bacteriosis of grain crops Pseudomonas syringae pv. atrofaciens. The aim of*

this work was to study the antimicrobial effect of the exometabolites, produced by isolated strain, towards gram-negative phytopathogenic microorganisms using the method of deferred antagonism under the condition of cultivating the antagonistsc bacterium for 72 and 120 hours before inoculation of test cultures. Microorganisms stored in the collection of the D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine: Ralstonia solanocearum B-1109, Pectobacterium carotovora subsp. carotovora B-1077, Pseudomonas syringae pv. syringae B-1022, Pseudomonas syringae pv. syringae van Hall 1902 B-1027, Pseudomonas syringae pv. atrofaciens B-1011, Pseudomonas syringae pv. atrofaciens B-1013, as well as Erwinia amylovora ATCC 15580 were used as a test-cultures. Paenibacillus polymyxa P6 exometabolites were found to have a dose-dependent antimicrobial effect towards all studied microorganisms. The most pronounced inhibitory effect was registered against Erwinia amylovora ATCC 15580, Pseudomonas syringae pv. syringae B-1022 and Ralstonia solanocearum B-1109: the diameter of the zone of no growth under the action of exometabolites produced for 120 hours are 25.72 ± 4.0 mm, 22.93 ± 2.0 mm and 20.30 ± 4.0 respectively. These results substantiate the expediency of further investigation of the composition and biological activity of the studied exometabolites in the perspective of developing biotechnological preparations.

Key words: *phytopathogens, Paenibacillus polymyxa, endophyte, exometabolites, antibacterial action*