

<sup>1</sup>Н.В. ПИЛЯК

<sup>2</sup>Л.Л. ЛОБАН

<sup>1</sup>Інженерно-технологічний інститут «Біотехніка», НААН України,  
Маяцька дорога, 26, смт Хлібодарське, Одеський р-н,  
Одеська обл., 67667, Україна

## СКРИНІНГ КОЛЕКЦІЙНИХ ШТАМІВ ДЛЯ СТВОРЕННЯ АСОЦІАЦІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ З НЕМАТОЦИДНОЮ АКТИВНІСТЮ

**Мета.** Відбір колекційних штамів для створення стійкої асоціації мікроорганізмів, яка слугуватиме основою нового комплексного препарату проти галових і цистоутворюючих нематод. **Методи.** Застосовано комплекс загальноприйнятих методик та методичних підходів для проведення скринінгу колекційних штамів з нематофаговою ефективністю. **Результати.** В лабораторних умовах проведено скринінг восьми колекційних мікроорганізмів. Для подальших досліджень відібрано п'ять штамів мікроміцетів з нематоцидною активністю проти цистоутворюючих і галових нематод. Досліджено взаємовідносини, життєздатність, динаміку росту і розвитку потенційних агентів біологічного контролю фітопаразитичних нематод на агаризованих поживних середовищах. **Висновки.** За спільного культивування мікроорганізмів на агаризованих поживних середовищах встановлено, що штамми *Orbilia oligospora* (*Arthrobotrys oligospora*), *Hirsutella rhossiliensis*, *Metarhizium anisopliae*, *Purpureocillium lilacinum* (*Paecilomyces lilacinus*), *Metacordyceps chlamydosporia* (*Pochonia chlamydosporia*) не проявляють антагоністичних властивостей і можуть бути використані для створення стійкої асоціації мікроорганізмів з нематоцидною активністю.

**галові нематоди; колекційні мікроорганізми; комплексні біопрепарати; мікроскопічні гриби; нематоцидна активність; цистоутворюючі нематоди**

Нематоди — важливий компонент співтовариства і є самими багаточисельними створіннями на Землі. Ідентифіковано понад 4000 видів нематод, які паразитують на рослинах. Нематоди — підступні шкідники з високим інвазійним потенціалом, популяція яких може стати причиною втрати до 80—90% врожаїв. У сукупності нематоди знищують кожного року близько 14% світового врожаю рослинниц-

тва [1, 2]. За репродуктивний період, який триває від 2 до 3 місяців, самиця нематоди може відкласти до 2500 яєць. Зимують нематоди в ґрунті в стадії яєць або личинок, які укладені в капсулу (оболонку) або цисту старої самиці. За температури 18—21°C і вологості понад 80% нематоди починають активно розмножуватись [1—3].

Вид галових нематод вперше було описано ще в 1855 р. британським ученим Майлзом Джозефом Берклі. Він спостерігав характерні гали (потовщення) на коренях огірків і описав вплив цього шкідника на рослини. Цистоутворюючу нематоду вперше описав у 1959 р. німецький зоолог Герман Адольф де Ман. З того часу в усьому світі ведуться різні дослідження в пошуках ефективних засобів для знищення галових і цистоутворюючих нематод. Запропоновано багато засобів і препаратів, але досі у світі не існує стовідсоткового ефективного засобу проти цих паразитів. Найбільш шкідливі нематоди в закритому ґрунті. Вони легко переносяться знаряддями праці, транспортом, садивним матеріалом, вітром, а також рослинними рештками. Нематоди уражують практично всі види рослин: овочеві, зернові культури, коренеплоди (картоплю, буряк), плодово-ягідні насадження, а в останні роки з'явилися відомості про ураження кукурудзи, цибулі, часнику, зеленних культур [4, 5].

Шкідливість посилюється тим, що багато видів нематод є переносниками грибних, бактеріальних і вірусних хвороб культурних рослин. Продукти метаболізму нематод викликають некротичні зони на листках, стеблах рослин та відмирання коренів, що сприяє вторинному заселенню їх шкідливими грибами і бактеріями [6, 7].

Наразі є деякі хімічні пестициди, ефективні проти нематод, але вони дуже часто руйнують озоновий шар ґрунту. Останніми роками в агропромисловій практиці заборонено застосування хімічних пестицидів на овочевих і плодово-ягідних культурах, тому наразі актуальний



а

б

в

**Рис. 1. Ураження рослин фітопаразитичними нематодами:**  
а — гали на коренях томатів; б — гали на коренях та коренеплодах моркви;  
в — цисти на коренях картоплі

пошук альтернативних засобів захисту від нематод, до яких належать біологічні препарати.

Компанією «Байер» зареєстровано в Україні унікальний протруйник на кукурудзі «Пончо® Вотиво», до складу якого, окрім діючої хімічної речовини Клотіанідин, входить штам бактерії *Bacillus firmus*, який захищає кореневу систему рослин від впливу нематод, утворюючи живий бар'єр, який зростає з розвитком кореневої системи і оберігає рослини від ураження всіма видами фітогельмінтів.

В Україні рекомендовано для захисту від галових нематод препарати — Актофит, Нематофагін-Біо (виробник «Черкасибіозахист»), Нематофагін М (виробник «Біоцентр»). Користуються попитом біопрепарати проти галових нематод на основі хижого гриба *Arthrobotrys oligospora*: порошок Нематодос (виробник ФОП «Саєвський Ю.Ю.», м. Чернігів) і рідкий Нематофагін БТ (виробник ІТІ «Біотехніка» НААН, м. Одеса) [8, 9].

Наразі комплексного біозасобу, який би міг ефективно і одночасно пригнічувати розвиток галових і цистоутворюючих нематод немає.

**Мета досліджень.** Відбір колекційних штамів для створення стійкої асоціації мікроорганізмів, яка слугуватиме основою нового комплексного препарату проти галових і цистоутворюючих нематод.

**Матеріали та методи досліджень.** Дослідження проводили з використанням загальноприйнятих методик та методичних підходів, що використовуються в мікробіології та біотехнології [10, 11].

**Результати досліджень та обговорення.** В колекції ІТІ «Біотехніка» НААН, що має статус Національного надбання [12], окрім хижого гриба *Orbilbia oligospora*, зберігаються й інші мікроорганізми, котрі можуть бути застосовані в біотехнологіях для створення стійкої асоціації мікроорганізмів з нематофаговою ефективністю, яка стане основою комплексного мікробіологічного препарату нематоцидної дії проти галових і цистоутворюючих нематод.

В роботу взято шість штамів мікроміцетів і два штами із роду *Bacillus* (природних ізолятів), виду назву яких не встановлено, але відомо їх целюлозолітичні властивості при застосуванні в комплексних препаратах — біодеструкторах. Тобто, ці бациллярні штами здатні утворювати ферменти, які, можливо, були б корисними при створенні стійкої асоціації мікроорганізмів з нематоцидною ефективністю.

Із літературних джерел підібрано особливості цих таксонів з одночасною вибіркою даних про об'єкти їхнього пригнічення [1, 2, 13—15].

Всі мікроорганізми, які наведено в таблиці 1, характеризуються генетичною різноманітністю та пригніченням нематодної активності. Окрім того, всі ці штами здатні продукувати токсичні метаболіти чи утворювати біологічні пристосування, які зможуть супресувати розвиток не тільки галових але і цистоутворюючих нематод за умов одер-

## 1. Нематофагові особливості штамів


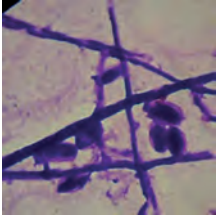

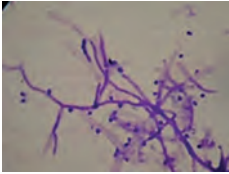

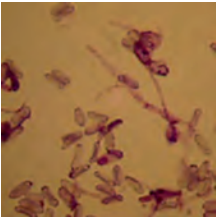

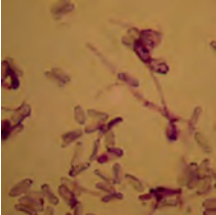

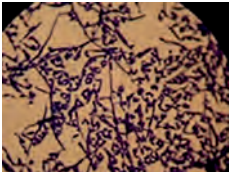
№ з/п	Найменування штаму	Нематофагові особливості штаму	Об'єкти пригнічення
1	<i>Orbilina oligospora</i> , шт. 12	Синтезує лінолієву кислоту та комплекс токсичних ферментів. Має спеціальні пристосування: пастки і клейкі голівки для відлову і умиртвіння личинок	Личинки галових нематод
2	<i>Hirsutella rhossiliensi</i> , шт. 10	Токсичні конідії	Личинки галових і цистоутворюючих нематод
3	<i>Metarhizium anisopliae</i> , шт. МАЛИ	Конідії, хламідоспори, токсичні метаболіти	Личинки нематод
4	<i>Purpureocillium lilacinum</i> , шт. 14	Інфекційні гіфи і конідії	Паразити на яйцях і самицях галових нематод
5	<i>Metacordyceps chlamydosporia</i> , шт. 277	Одноклітинні конідії і багатоклітинні діхтіохламідоспори, токсичні ферменти	Уражує яйця нематод. За допомогою ферментів проникає в желатиновий матрикс цистоутворюючих і галових нематод
6	<i>Trichoderma viride</i> , шт. 256	Гіфи, конідії та ферменти	Уражує травний канал нематод
7	<i>Bacillus sp.</i> , БД-5	Ферменти з целюлозолітичною дією	Потребує досліджень
8	<i>Bacillus sp.</i> , ТР-6	Ферменти з целюлозолітичною дією	Потребує досліджень

жання стійкої асоціації мікроорганізмів при їх спільному глибинному культивуванні.

Досліджено культуральні властивості колекційних культур з нематофаговими характеристиками: ріст на агаризованих поживних середовищах і морфологію конідій, гіф під мікроскопом (табл. 2).

***Orbilina oligospora*, шт. 12.** На середовищах Сабуро, СА — міцелій білий ватоподібний, набуває рожевого відтінку під дією денного світла. Біохімічні особливості: засвоює глюкозу, лактозу, цукрозу, мелясу. Синтезує органічну лінолієву кислоту та комплекс ферментів — протеаз. Мікроскопія: конідії двоклітинні, мають довгасту грушеподібну форму. Середній розмір 27,2 × 15,1 мкм. У присутності нематод інколи спонтанно утворює ловчі петлі.

## 2. Морфокультуральні властивості грибних штамів

№ з/п	Найменування штаму	Ріст на агаризованих поживних середовищах	Морфологія клітин під мікроскопом
1	<i>Orbilina oligospora</i> , шт. 12		
2	<i>Hirsutella rhossiliensis</i> , шт. 10		
3	<i>Metarhizium anisopliae</i> , шт. МАЛІ		
4	<i>Purpureocillium lilacinus</i> , шт. 14		
5	<i>Metacordyceps chlamydosporia</i> , шт. 277		

*Hirsutella rhossiliensis*, шт. 10. На Сабуро, СА — міцелій білий ватоподібний, при зберіганні набуває лілового відтінку. Мікроскопія: на фоні розгалуженого міцелію формує конідії та діхтіохламідоспори.

*Metarhizium anisopliae*, шт. МАЛІИ. Колонії на агарових середовищах спочатку білого кольору, а по мірі дозрівання конідій стають зеленого чи бурого кольору. Біохімічні особливості: продукує токсичні метаболіти, за рахунок яких проявляється інсектицидна дія препарату. Мікроскопія: септований міцелій, конідії в ланцюгах. Конідії одноклітинні, продовгувато-овальні або циліндричні,  $4,5-12 \times 1,6-3,5$  мкм. В рідкому препараті інколи на міцелії утворюються хламідоспори (до  $3-5 \times 10^9$  бластоспор/см<sup>3</sup>).

*Purpureocillium lilacinus*, шт. 14. На середовищах СА, Сабуро, зазвичай, формує повстяні бархатисті колонії фіолетового кольору. Біохімічні особливості: утворює інфекційні гіфи, які обмотують яйця нематод зверху, проникають вглиб і поглинають їхній вміст. Паразитують на яйцях самиць галових нематод. Позитивною особливістю гриба є його здатність продукувати в глибинних умовах повітряні конідії з розвиненою оболонкою. Мікроскопія: конідії шорсткі або гладенькі, еліпсоподібні або округлі, розміром  $2,5-3,0 \times 2,0-2,2$  мкм, дуже часто в ланцюгах. Міцелій тонкий, ажурний.

*Metacordyceps chlamydosporia*, шт. 277. На агаризованих середовищах (СА і Сабуро) утворює густий ватоподібний наліт білого кольору. Біохімічні особливості: в желатиновому матриксі нематод синтезує ферменти наматоцидної дії. Мікроскопія: на фоні розгалуженого міцелію формує одноклітинні конідії. Характерною особливістю є утворення великих термінальних багаточисленних діхтіохламідоспор (до 30—40 мкм).

Попередньо було визначено взаємовідносини між штамами, які застосовано в препаративній композиції. На жаль, бацилярні штами не витримали конкуренцію грибних культур на комбінованих поживних середовищах і за рахунок швидкої експансії мікроскопічних грибів втратили ростову здатність на агаризованих субстратах. Ці штами було активно супресовано більш агресивними штамами. Штам *Trichoderma viride* 256, якому властива нематоцидна активність, частково або повністю пригнічував ріст і розвиток бактеріальних і грибних мікроорганізмів за спільного культивування на агаризованих поживних середовищах, тому його було виключено із схеми подальших досліджень.

За результатами скринінгу восьми колекційних культур мікроорганізмів відібрано п'ять штамів з нематофаговою ефективністю та досліджено особливості і цикли розвитку при рості на агаризованих поживних середовищах (рис. 2).

Результати досліджень взаємовідносин між мікроміцетами показали, що досліджувані мікроорганізми не конкурують за поживні речо-

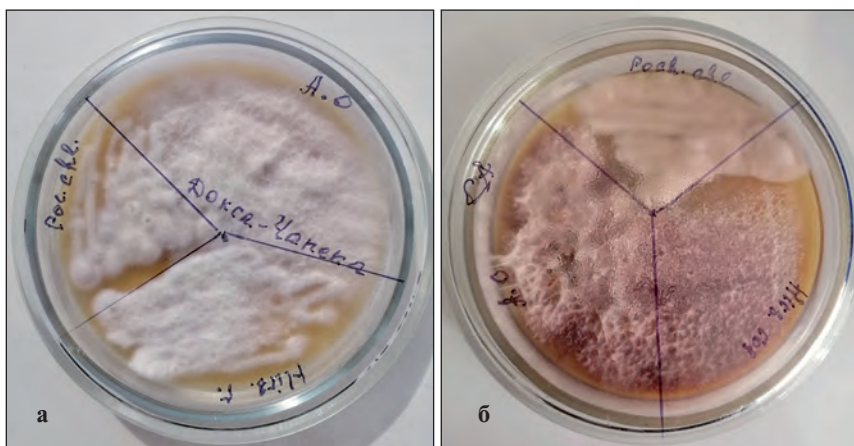


Рис. 2. Взаємовідносини між колекційними штамами на агаризованих поживних середовищах:  
а — Чапека Докса; б — сусло-агар

вини, не використовують ресурси своїх сусідів для власного росту та розвитку, не подавляють ріст конкурентів, а живуть у симбіозі. Отже, можна сподіватися, що ці взаємовідносини дадуть позитивні результати за глибинного культивування, а в подальшому і при створенні комплексного препарату з нематофаговою активністю.

Для грибних культур *Purpureocillium lilacinus*, *Hirsutella rhossiliensis*, *Metacordyceps chlamydosporia* підготовлено облікові картки з номенклатурними даними: таксономічним статусом, типом, авторами родовиду, датою надходження в Колекцію, де і ким виділено та ідентифіковано штам. В облікових картках вказано також методи зберігання в Колекції, умови росту, строки пересівів та особливості кожного штаму.

Два штами, із відібраних в результаті скринінгу, депоновано в Українській колекції непатогенних мікроорганізмів НАН України:

- *Orbilbia oligospora* — хижий гриб, номер в колекції F-100047 (2009 р.);
- *Metarhizium anisopliae* — штам з ентомопатогенними властивостями — F-100090 (2015 р.).

Всі штами, які відібрано за результатами скринінгу, мають унікальні властивості, і їх застосування в подальших дослідженнях може бути ефективним рішенням при створенні препаративних композицій з нематоцидною активністю проти галових і цистоутворюючих нематод.

## ВИСНОВКИ

За результатами скринінгу відібрано п'ять штамів з нематоцидною активністю: *Orbilia oligospora*, *Hirsutella rhossiliensis*, *Metarhizium anisopliae*, *Purpureocillium lilacinus*, *Metacordyceps chlamydosporia*. Досліджено культуральні властивості, морфологію конідій і гіф під мікроскопом. Із літературних джерел підібрано характеристики цих штамів, а також визначено об'єкти їх пригнічення. Відібрано штами, які здатні продукувати токсичні метаболіти, утворювати хламідоспори і біологічні пристосування для пригнічення нематод. Є сподівання, що всі характеристики відібраних штамів будуть проявлятися в асоціації мікроорганізмів і стануть ефективним рішенням при створенні комплексного препарату з нематофаговою активністю.

**Фінансування:** дослідження проводили в рамках ПНД 11 НААН «Біологічні методи захисту рослин за умов екологізації землеробства» («Біоконтроль»); ДР № 0124U002069.

**Конфлікт інтересів:** автори декларують про відсутність конфлікту інтересів.

## БІБЛІОГРАФІЧНИЙ СПИСОК

1. Duponnois R., Kisa M., Plenchette C. Phosphate-solubilizing potential of the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 2006. V. 169. Is. 2. P. 280-282. <https://doi.org/10.1002/jpln.200520551>
2. Босий О.В. Фітопатогенні нематоди - одна з основних причин низької урожайності ягідних культур. 2022.
3. Stirling G.R. *Biological Control of Plant Parasitic Nematodes: Progress, Problems and Prospects*. Wallingford: CAB International, 1991. 282 p.
4. Taylor C.E., Brown D.J.F. *Nematodes vectors of plant viruses*. Wallingford, UK: CAB International, 1997. 286 p.
5. Thorne G. *Principles of Nematology*. McGraw Hill-Book Com. Inc., New York, 1961. 553 p.
6. Trudgill D.L. Resistance to and Tolerance of Plant Parasitic Nematodes in Plants. *Annu. Rev. of Phytopatol.* 1991. V. 29. P. 167-192. <https://doi.org/10.1146/annurvtv.29.090191.001123>
7. Weischer B. Where to go in Phytonematode control? *Phytoparasitica*. 1994. 22. P. 95-99. <https://doi.org/10.1007/BF02980313>
8. Weischer B., Brown D.J.F. *An Introduction to Nematodes: General Nematology: a Student's Textbook*. Sofia: Pensoft, 2001. 187 p.
9. Williamson V.M., Hussey R.S. Nematode pathogenesis and Resistance in plants. *The Plant Cell*. 1996. V. 8. Is. 10. P. 1735-1745. doi: 10.1105/tpc.8.10.1735

10. Лобова О.В., Левішко А.С., Гуменюк І.І. Біотехнології. Навчальний посібник. Київ: Вид. НУБіП України. 2021. 548 с.

11. Волкогон В.В., Надкринична О.В., Токмакова Л.М. та ін. Експериментальна ґрунтова мікробіологія ; за наук. ред. В.В. Волкогона. Інститут сільськогосподарської мікробіології. Чернівці, 2010. С. 308-382.

12. Пиляк Н.В., Лобан Л.Л. Колекція промислово цінних культур мікроорганізмів для біологізації землеробства. Мікробіологія і біотехнологія. 2023. № 3. С. 60-66. [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2023.3\(59\).286968](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2023.3(59).286968)

13. Ілюстрований довідник регульованих шкідливих організмів в Україні; укладачі Башинська О.В., Константинова Н.К., Пилипенко Л. та ін. Київ: Урожай, 2009. 249 с.

14. Станкевич С.В., Леженіна І.П., Забродіна І.В. Регульовані некарантинні шкідливі організми. Навчальний посібник. Харків. Нац. аграр. ун-т ім. В.В. Докучаєва. Харків: Вид. Іванченка І.С., 2022. 140 с.

15. Станкевич С.В., Забродіна І.В., Васильєва Ю.В. Моніторинг шкідників і хвороб сільськогосподарських культур. Навчальний посібник. Харків. Нац. аграр. ун-т ім. В.В. Докучаєва. Харків: ФОП Бровін О.В., 2020. 624 с.

**Pyliak N.**, ORCID: 0000-0002-5074-4011

**Loban L.**, ORCID: 0009-0001-4437-4480

Engineering and Technological Institute «Biotechnika» of the NAAS,  
26, Mayatska road, Khlivodarske township, Odesa district,  
Odesa region, 67667, Ukraine

### **Screening of collection strains to create association of microorganisms with nematocidal activity screening**

**Goal.** Selection of collection strains to create a stable association of microorganisms, which will serve as the basis of a new complex drug against gall and cyst-forming nematodes. **Methods.** A complex of generally accepted methods and methodical approaches was applied for the screening of collection strains with nematophagous efficiency. **Results.** Eight collection microorganisms were screened in laboratory conditions. Five strains of fungal etiology with nematocidal activity against cyst-forming and gall nematodes were selected for further research. The relationships, viability, dynamics of growth and development of potential biological control agents of phytoparasitic nematodes on agarized nutrient media were studied. **Conclusions.** During joint cultivation of the investigated microorganisms on agarized nutrient media, it was established that *Orbilia oligospora*, *Hirsutella rhossiliensis*, *Metarhizium anisopliae*, *Purpureocillium lilacinus*, *Metacordyceps chlamydosporia* strains do not exhibit antagonistic properties and can be used to create a stable association of microorganisms with nematocidal activity.

**dalls nematodes; collection microorganisms; complex biopreparations; microscopic fungi; nematocidal activity; cyst-forming nematodes**

## REFERENCES

1. Duponnois R., Kisa M., Plenchette C. (2006). Phosphate-solubilizing potential of the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 169(2), 280-282. <https://doi.org/10.1002/jpln.200520551>
2. Bosyj O.V. (2022). Fitopatohenni nematody — odna z osnovnykh prychnyn nyz'koi urozhajnosti iahidnykh kul'tur. [Phytopathogenic nematodes are one of the main reasons for the low yield of berry crops]. (in Ukrainian).
3. Stirling G.R. (1991). *Biological Control of Plant Parasitic Nematodes: Progress, Problems and Prospects*. Wallingford: CAB International. 282 p.
4. Taylor C.E., Brown D.J.F. (1997). *Nematodes vectors of plant viruses*. Wallingford, UK: CAB International. 286 p.
5. Thorne G. (1961). *Principles of Nematology*. McGraw Hill-Book Com. Inc., New York. 553 p.
6. Trudgill D.L. (1991). Resistance to and Tolerance of Plant Parasitic Nematodes in Plants. *Annu. Rev. of Phytopatol.* 29, 167-192. <https://doi.org/10.1146/annurvtv.py.29.090191.001123>
7. Weischer B. (1994). Where to go in Phytonematode control? *Phytoparasitica*, (22), 95-99. <https://doi.org/10.1007/BF02980313>
8. Weischer B., Brown D.J.F. (2001). *An Introduction to Nematodes: General Nematology: a Student's Textbook*. Sofia: Pensof., 187 p.
9. Williamson V.M., Hussey R.S. (1996). Nematode pathogenesis and Resistance in plants. *The Plant Cell.*, 8(10), 1735-1745. doi: 10.1105/tpc.8.10.1735
10. Lobova O.V., Levishko A.S., Humeniuk I.I. (2021). *Biotekhnolohii. Navchal'nyj posibnyk. [Biotechnology. Study guide]*. Kyiv: Vyd. NUBiP Ukrainy. 548 p. (in Ukrainian).
11. Volkohon V.V., Nadkrynychna O.V., Tokmakova L.M. et al. (Volkohon V.V. Ed.). (2010). *Ekspyrymental'na gruntova mikrobiolohiia. [Experimental soil microbiology]*. Instytut sil's'kohospodars'koi mikrobiolohii. Chernihiv, 308-382. (in Ukrainian).
12. Pyliak N.V., Loban L.L. (2023). Kolektsiia promyslovo tsinnykh kul'tur mikroorhanizmv dlia biolohizatsii zemlerobstva. [A collection of industrially valuable cultures of microorganisms for the biologization of agriculture]. *Mikrobiolohiia i biotekhnolohiia*, (3), 60-66. [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2023.3\(59\).286968](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2023.3(59).286968) (in Ukrainian).
13. Bashyns'ka O.V., Konstantinova N.K., Pylypenko L. ta in. (ukladachi) (2009). *Iliustrovanyj dovidnyk rehu'lovanykh shkidlyvykh orhanizmv v Ukraini*.

[Illustrated directory of regulated harmful organisms in Ukraine]. Kyiv: Urozhaj, 249 p. (in Ukrainian).

14. Stankevych S.V., Lezhenina I.P., Zabrodina I.V. (2022). Rehuľovani nekarantynni shkidlyvi orhanizmy. Navchal'nyj posibnyk. [Regulated non-quarantine pests. Study guide]. Kharkiv. Nats. ahrar. un-t im. V.V. Dokuchaieva. Kharkiv: Vyd. Ivanchenka I.S., 140 p. (in Ukrainian).

15. Stankevych S.V., Zabrodina I.V., Vasyľieva Yu.V. (2020). Monitorinh shkidnykiv i khvorob sil's'kohospodars'kykh kul'tur. Navchal'nyj posibnyk. [Monitoring of pests and diseases of agricultural crops. Study guide]. Kharkiv. Nats. ahrar. un-t im. V.V. Dokuchaieva. Kharkiv: FOP Brovin O.V., 624 p. (in Ukrainian).

**Надійшла до редакції:** 19.09.2024

**Прийнята до друку:** 12.11.2024

**Надруковано:** грудень, 2024

**Опубліковано онлайн:** лютий, 2025