



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Iš dirvožemio išskirtų *Bacillus spp.* bakterijų tyrimai ir jų  
antimikrobinio poveikio prieš augalų patogeninius grybus  
įvertinimas**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Kristijonas Pečiulis**

Projekto autorius

**Dr. Renata Žvirdauskienė**

Vadovė

---

**Kaunas, 2023**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Iš dirvožemio išskirtų *Bacillus spp.* bakterijų tyrimai ir jų  
antimikrobinio poveikio prieš augalų patogeninius grybus  
įvertinimas**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

---

**Kristijonas Pečiulis**

Projekto autorius

**Dr. Renata Žvirdauskienė**

Vadovė

**Prof. Dr. Aušra Šipailienė**

Recenzentė

---

**Kaunas, 2023**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

Kristijonas Pečiulis

## **Iš dirvožemio išskirtų *Bacillus spp.* bakterijų tyrimai ir jų antimikrobinio poveikio prieš augalų patogeninius grybus įvertinimas**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama(s) kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi(s) Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjęs (-usi);
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta(s) iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Kristijonas Pečiulis

*Patvirtinta elektroniniu būdu*

Pečiulis, Kristijonas. Iš dirvožemio išskirtų *Bacillus spp.* bakterijų tyrimai ir jų antimikrobinio poveikio prieš augalų patogeninius grybus įvertinimas. Magistro baigiamasis projektas / vadovė dr. Renata Žvirdauskienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): biotechnologijos, technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: *Bacillus spp.*, bakterijos, augalai, biotrašos, slopinimas, patogenai.

Kaunas, 2023. 61 p.

### Santrauka

Augant žmonijos populiacijai, didėja maisto paklausa. Esant didesniai maisto poreikiui, atsiranda paklausa stiprinti agrokultūros pajėgumą. Siekimas gauti didesnes pasėlių išeigas reikalauja didesnio pesticidų sunaudojimo, dėl ko yra neigiamai veikiama tiek aplinka, tiek žmonių sveikata. Alternatyvus sprendimas – biopesticidai, kurie yra nepavojingi aplinkai, žmonių ir gyvūnų sveikatai. Mūsų atliktame tyrime buvo tiriama, ar iš dirvožemio išskirtos bakterijos gali tapti alternatyva sintetiniams pesticidams ir slopinti augalų fitopatogenus, kartu skatindami augalo augimą.

Antagonistiniams bakterijų atsparumui prieš augalų fitopatogeninius grybus (*Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum 4*, *F. graminearum 13121*, *F. graminearum 5883*, *F. avenaceum*) buvo naudojamos šešios etaloninės *Bacillus spp.* bakterijų kultūros (*B. cereus* (B<sub>1</sub>), *B. circulans* (B<sub>2</sub>), *B. coagulans* (B<sub>3</sub>), *B. megaterium* (B<sub>4</sub>), *B. subtilis* (B<sub>5</sub>), *B. sphaericus* (B<sub>6</sub>), kartu su šešiomis iš dirvožemio išskirtomis bakterijomis (022-3 (B<sub>7</sub>), 022-4 (B<sub>8</sub>), 2-1 (B<sub>9</sub>), 4-2 (B<sub>10</sub>), 8-1 (B<sub>11</sub>), 8-2 (B<sub>12</sub>)) ir tiriamas jų slopinimo intensyvumas 25 °C ir 37 °C temperatūrose. Augalų augimo skatinimo tyrimuose buvo naudojamos iš dirvožemio išskirtos bakterijos.

Mūsų tyrime efektyviausiai bakterijų kultūros slopino *Fusarium avenaceum*, *Fusarium graminearum 4* ir *Fusarium graminearum 13121* fitopatogeninius grybus. Tiriant inkubavimo temperatūros (25 °C ir 37 °C) įtaką, nustatyta, kad žemesnėje temperatūroje didžiausią augimą slopinančią įtaką fitopatogeniniams grybams turėjo B<sub>12</sub> mėginys (naudojama 8-2 iš dirvožemio išskirta bakterijų kultūra). 37 °C temperatūros įtaka fitopatogeniniams grybams buvo didesnė, negu tiriamųjų bakterijų kultūrų poveikis, nes pati temperatūra veikė grybų augimą slopinančiai. Pritaikant iš dirvožemio išskirtų bakterijų suspensijas augalų augimo skatinimui, apveliant jomis augalų sėklas prieš sėjimą, buvo padidintas augalo daigų, lapelių skaičius, bei gautas didesnis jo bendras svoris, tačiau mažesni stiebo, šaknų ilgiai, bei buvo padidėjęs nudžiūvusių lapelių skaičius.

Pečiulis, Kristijonas. Studies of *Bacillus spp.* Bacteria Isolated From Soil and Evaluation of Their Antimicrobial Activity Against Plant Pathogenic Fungi. Master's Final Degree / supervisor Assoc. Dr. Renata Žvirdauskienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): biotechnology, technological sciences.

Keywords: *Bacillus spp.*, bacteria, plants, biofertilizers, inhibition, pathogens.

Kaunas, 2023. 61.

### Summary

As the human population grows, the demand for food increases. In order to meet the growing demand for food, agricultural capacity needs to be enhanced. The pursuit of higher crop yields requires greater use of pesticides, which negatively impacts both the environment and human health. An alternative solution is biopesticides, which are safe for the environment, human and animal health. In our research, it was investigated whether bacteria isolated from the soil can become an alternative to synthetic pesticides and inhibit plant phytopathogens while promoting plant growth as well.

Six reference *Bacillus spp.* bacterial cultures (*B. cereus* (B<sub>1</sub>), *B. circulans* (B<sub>2</sub>), *B. coagulans* (B<sub>3</sub>), *B. megaterium* (B<sub>4</sub>), *B. subtilis* (B<sub>5</sub>), *B. sphaericus* (B<sub>6</sub>), together with six from soil isolated bacteria (022-3 (B<sub>7</sub>), 022-4 (B<sub>8</sub>), 2-1 (B<sub>9</sub>), 4-2 (B<sub>10</sub>), 8-1 (B<sub>11</sub>), 8-2 (B<sub>12</sub>)) were tested as inhibitors to fitopathogens. Bacteria isolated from the soil were tested on their inhibition intensity by incubating at 25 °C and 37 °C. Bacteria isolated from soil were used in plant growth promotion studies.

In our study, bacterial cultures inhibited the phytopathogenic fungi *Fusarium avenaceum*, *Fusarium graminearum* 4 and *Fusarium graminearum* 13121 most effectively. When incubating the samples at temperatures of 25 °C and 37 °C, it was found that the bacterial culture isolated from soil 8-2 used in sample B<sub>12</sub> had the greatest influence on phytopathogenic fungi at lower temperatures, in another study, the temperature of 37 °C had the greatest influence on phytopathogenic fungi. Applying the suspensions of bacteria isolated from the soil to plant seeds, the number of sprouts and leaves of the plant was increased, and its total weight was higher, but the stem and root lengths were smaller, and the number of dried leaves was increased.

## Turinys

<b>Santrumpų ir terminų sąrašas .....</b>	<b>10</b>
<b>Įvadas.....</b>	<b>11</b>
<b>1. Literatūros apžvalga .....</b>	<b>12</b>
1.1. Mikroorganizmai randami dirvožemyje .....	12
1.2. Bendra dirvožemio struktūra .....	12
1.3. Patogeniniai grybai, jų sukeltos ligos ir kontrolės metodai.....	13
1.3.1. Mikotoksinai.....	13
1.3.2. Fuzariozė .....	13
1.3.3. <i>Fusarium graminearum</i> .....	14
1.3.4. <i>Fusarium avenaceum</i> .....	14
1.3.5. <i>Aspergillus flavus</i> .....	14
1.4. Dirvožemyje randamų <i>Bacillus spp.</i> bakterijų apibūdinimas ir jų pritaikymas skirtingose srityse.....	15
1.5. Mikroorganizmai kaip biotrašos.....	15
1.6. Mikrobinių biopesticidų privalumai ir trūkumai .....	16
1.7. <i>Bacillus spp.</i> ir patogeninių grybų sąveika. Slopinimui išskiriamos medžiagos.....	17
1.7.1. Fermentų sintezė.....	17
1.8. <i>Bacillus spp.</i> kaip augalų augimo skatintojas.....	20
1.8.1. <i>Bacillus spp.</i> išskiriami fitohormonai.....	20
1.9. Praktinis biotrašų pritaikymas .....	20
1.9.1. Skystos biotrašos .....	21
1.10. Literatūros apžvalgos apibendrinimas .....	22
<b>2. Medžiagos ir tyrimų metodai .....</b>	<b>23</b>
2.1. Pagrindinės tyrimų kryptys ir jų pagrindimas .....	23
2.2. Bakterijų išskyrimas iš dirvožemio .....	24
2.3. <i>Bacillus spp.</i> bakterijų išskyrimas ir gryninimas.....	25
2.4. Bakterijų identifikavimas Gram'o dažymo metodu .....	26
2.5. Iš dirvožemio išskirtų <i>Bacillus spp.</i> poveikio augalų augimo skatinimui tyrimai .....	27
2.6. Mikroskopinio grybo auginimas.....	27
2.7. Antagonistinių savybių tyrimai dvigubos kultūros metodu.....	28
2.7.1. Bakterijų antagonistinio poveikio vertinimas prieš patogeninius grybus naudojant slopinimo koeficientą .....	31
2.7.2. Bakterijų antagonistinio poveikio vertinimas prieš patogeninius grybus inkubuojant 25 °C ir 37 °C temperatūrose .....	31
2.8. Biocheminiai išskirtų bakterijų kultūrų identifikacijos metodai .....	31
2.8.1. Ureazės metodas .....	31
2.8.2. Katalazės metodas .....	32
2.8.3. Krakmolo hidrolizacijos tyrimas .....	32
<b>3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....</b>	<b>34</b>
3.1. Bakterijų identifikavimas Gram'o dažymo metodu .....	34
3.2. Bakterijų biocheminiai identifikavimo metodai .....	34
3.2.1. Ureazės testas .....	35

3.2.2. Katalazės metodas .....	35
3.2.3. Krakmolo hidrolizacijos tyrimas .....	35
3.3. <i>Bacillus spp.</i> poveikis augalų augimo skatinimui .....	36
3.4. <i>Bacillus spp.</i> antagonistinių savybių nustatymas naudojant etalonines ir iš dirvožemio išskirtas bakterijas.....	37
3.5. <i>Bacillus spp.</i> antagonistinių savybių nustatymas prieš fitopatogeninius grybus naudojant iš dirvožemio išskirtas bakterijas, inkubuojant skirtingose temperatūrose – 25 °C ir 37 °C.....	42
3.5.1. <i>Fusarium graminearum</i> 13121 slopinimas inkubuojant 25 °C ir 37 °C kartu su iš dirvožemio išskirtomis <i>Bacillus spp.</i> bakterijomis .....	42
3.5.2. <i>Fusarium graminearum</i> 5883 slopinimas inkubuojant 25 °C ir 37 °C kartu su iš dirvožemio išskirtomis <i>Bacillus spp.</i> bakterijomis .....	44
3.5.3. <i>Fusarium graminearum</i> 4 slopinimas iš dirvožemio išskirtomis <i>Bacillus spp.</i> bakterijų poveikyje, inkubuojant 25 ir 37 °C temperatūroje.....	45
3.5.4. <i>Fusarium avenaceum</i> slopinimas iš dirvožemio išskirtų <i>Bacillus spp.</i> bakterijų poveikyje, inkubuojant 25 °C temperatūroje .....	47
<b>4. Rekomendacijų dalis .....</b>	<b>49</b>
<b>Išvados .....</b>	<b>51</b>
<b>Literatūros sąrašas .....</b>	<b>52</b>
<b>Publikacijų sąrašas .....</b>	<b>62</b>

## Lentelių sąrašas

<b>1.1 lentelė.</b> Biopesticidų privalumai ir trūkumai [63] .....	17
<b>1.2 lentelė.</b> Bakterijų charakteristikos [79] .....	19
<b>2.1 lentelė.</b> Tyrime naudota įranga.....	24
<b>2.2 lentelė.</b> Tyrime naudoti reagentai.....	24
<b>3.1 lentelė.</b> Bakterijų biocheminiai identifikavimo metodai („-“ – neigiamas; „+“ – teigiamas)...	34
<b>3.2 lentelė.</b> Bakterijų įtaka kviečių augimui .....	36
<b>3.3 lentelė.</b> Etaloninių ir iš dirvožemio išskirtų bakterijų slopinimo koeficientas (proc.) prieš <i>Fusarium graminearum</i> 4 grybą.....	38
<b>3.4 lentelė.</b> Etaloninių ir iš dirvožemio išskirtų bakterijų slopinimo koeficientas (proc.) prieš <i>Fusarium avenaceum</i> grybą.....	39
<b>3.5 lentelė.</b> Etaloninių ir iš dirvožemio išskirtų bakterijų slopinimo koeficientas (proc.) prieš <i>Fusarium graminearum</i> 13121 grybą.....	40
<b>3.6 lentelė.</b> Etaloninių ir iš dirvožemio išskirtų bakterijų slopinimo koeficientas (proc.) prieš <i>Fusarium graminearum</i> 5883 grybą.....	41
<b>4.1 lentelė.</b> Aparatūrinės schemos dalys .....	50



## Paveikslų sąrašas

<b>1.1 pav.</b> Biotrašų pritaikymas agrokultūroje [60] .....	16
<b>2.1 pav.</b> Principinė darbo schema .....	23
<b>2.2 pav.</b> Dirvožemio mėginių paėmimo vietos, Margininkų kaimas, Kauno r. ....	25
<b>2.3 pav.</b> Bakterijų gryninimas. ....	26
<b>2.4 pav.</b> Dvigubos kultūros sėjimo metodas .....	29
<b>2.5 pav.</b> Dvigubos kultūros sėjimo metodas, sėjant <i>Fusarium avenaceum</i> 4 .....	29
<b>2.6 pav.</b> Dvigubos kultūros sėjimo metodu užsėtos lėkštelės .....	30
<b>3.1 pav.</b> Bakterijų identifikavimas Gram'o dažymo metodu .....	34
<b>3.2 pav.</b> Katalazės metodo rezultatai.....	35
<b>3.3 pav.</b> Krakmolo hidrolizacijos rezultatai. ....	36
<b>3.4 pav.</b> <i>Fusarium avenaceum</i> grybo augimo slopinimo tyrimas, naudojant etalonines ir iš dirvožemio išskirtas bakterijas. Mėginiai su bakterijų kultūromis .....	40
<b>3.6 pav.</b> <i>Fusarium graminearum</i> 5883 augimo slopinimas etaloninių ir iš dirvožemio išskirtų bakterijų poveikyje .....	42
<b>3.7 pav.</b> <i>Fusarium graminearum</i> 13121 slopinimas iš dirvožemio išskirtų <i>Bacillus spp.</i> bakterijų poveikyje, auginant 25 °C temperatūroje, mm .....	43
<b>3.8 pav.</b> <i>Fusarium graminearum</i> 13121 slopinimas iš dirvožemio išskirtų <i>Bacillus spp.</i> bakterijų poveikyje, auginant 37 °C temperatūroje, mm .....	44
<b>3.9 pav.</b> <i>Fusarium graminearum</i> 5883 slopinimas iš dirvožemio išskirtų <i>Bacillus spp.</i> bakterijų poveikyje, auginant 35 °C temperatūroje, mm .....	44
<b>3.10 pav.</b> <i>Fusarium graminearum</i> 5883 slopinimas iš dirvožemio išskirtų <i>Bacillus spp.</i> bakterijų poveikyje, inkubuojant 37 °C temperatūroje, mm .....	45
<b>3.11 pav.</b> <i>Fusarium graminearum</i> 4 slopinimas iš dirvožemio išskirtų <i>Bacillus spp.</i> bakterijų poveikyje, inkubuojant 25 °C temperatūroje, mm .....	46
<b>3.12 pav.</b> <i>Fusarium graminearum</i> 4 slopinimas iš dirvožemio išskirtų <i>Bacillus spp.</i> bakterijų poveikyje, inkubuojant 37 °C, mm .....	46
<b>3.13 pav.</b> <i>Fusarium avenaceum</i> slopinimas iš dirvožemio išskirtų <i>Bacillus spp.</i> bakterijų poveikyje, inkubuojant 25 °C temperatūroje, mm.....	47
<b>3.14 pav.</b> <i>Fusarium avenaceum</i> slopinimas iš dirvožemio išskirtų <i>Bacillus spp.</i> bakterijų poveikyje, inkubuojant 37 °C temperatūroje, mm.....	48
<b>4.1 pav.</b> Aparatūrinė biotrašų schema .....	50

## Santrumpų ir terminų sąrašas

### Santrumpos:

**3-ADON** – acetildeoksinivalenolis;

**15-ADON** - 15-acetildeoksinivalenolis;

**BLS** – į bakteriocinus panašios medžiagos;

**GH** – glikozidų hidrolazės;

**IAR** - 3-indolilacto rūgštis;

**KSV** – kolonijas sudarantys vienetai;

## Įvadas

Augalų augimą skatinančių rizobakterijų pritaikymas agrokultūroje yra nepaliaujamai tobulinama sritis dėl jos vieno iš pagrindinių privalumų – tapti alternatyva cheminėms trąšoms, pesticidams bei kitoms kenksmingoms agrokultūroje naudojamoms medžiagoms [1].

Augalų ligos yra svarbus faktorius, kurią būtina kontroliuoti, kad auginamos maisto žaliavos agrokultūroje būtų kokybiškos, maistingos, bei saugios vartoti. Dauguma pasaulio žemdirbių yra stipriai priklausomi nuo cheminių pesticidų ir trąšų, norint, kad žemės ūkio produkcija pasiektų didelę produktų išeią. Dėl šių priežasčių šiuolaikiniai mokslininkai pradėjo skirti daugiau dėmesio į sintetinių agrocheminių medžiagų alternatyvą – biopesticidus [2]. Biopesticidų paskatintas pritaikymas žemdirbystės sektoriuje buvo dėl jų didesnio nei įprasto ekologiškumo ir efektyvumo. Jų pritaikymas leido jiems tapti alternatyviu biotrášų šaltiniu, kuriuo būtų siekiama sumažinti dėl paklausos didėjantį sintetinių trąšų ir pesticidų naudojimą. Biotrášos – tai medžiagos, savyje turinčios gyvų mikroorganizmų, skatinančios efektyvesnę ir greitesnę augalų vystymąsi. Šie mikroorganizmai taip pat pagerina dirvožemyje esančių maistinių medžiagų įsisavinimą, padidina augalo šaknų paviršiaus plotą bei fiksuoja azotą [3].

Ankstesniuose moksliniuose tyrimuose ne kartą buvo pranešama, kad didelė dalis augalų patogeninių ligų gali būti kontroliuojamos natūraliais antagonistiniais mikroorganizmais. Ryšys tarp antagonistinių mikroorganizmų ir augalų patogenų gali vykti dėl daugiau nei vieno faktoriaus. Jų sąveika galima ir dėl antagonistinių mikroorganizmų antipatogeninių cheminių medžiagų gamybos, konkurencijos dėl erdvės ar maisto medžiagų. Tarp antagonistinių bakterijų daugelis jų gali slopinti augalų fitopatogenus, tačiau didžiausias slopinimas nustatytas *Bacillus spp.* genčių. Antagonistinių *Bacillus spp.* rūšių kiekis ir pritaikymas labai sparčiai didėja, dėl jų unikalų savybių greitai daugintis, bei atsparumo nepalankioms aplinkos sąlygoms, tuo pačiu šios bakterijų rūšys turi labai platų biokontrolės galimybių spektrą. Lokieji junginiai išskiriami šių bakterijų taip pat atlieka labai svarbią funkciją skatinant augalų augimą bei atliekant apsauginę funkciją, kurių dėka yra sukeliamas sisteminis atsparumas augaluose [3].

Mūsų darbe buvo tiriama, kaip iš dirvožemio išskirtos bakterijos gali būti pritaikytos agrokultūros sektoriuje, kaip alternatyva cheminėms trąšoms bei pesticidams. Tyrimas atliktas naudojant iš dirvožemio išskirtas bakterijas, jas identifikuojant ir pritaikant fitopatogeninių augalų slopinime, lyginant su etaloninėmis *Bacillus spp.* genties bakterijomis taip pat vertinant, kaip inkubuojant mėginius skirtingose temperatūrose kinta augalų fitopatogenų augimas. Taip pat buvo nustatinėjama ar šios iš dirvožemio išskirtos bakterijos gali veikti kaip augalų augimą skatinančios medžiagos.

**Tyrimo tikslas** – iš dirvožemio išskirti ir išgryninti *Bacillus spp.* bakterijas, atlikti šių bakterijų atsparumo prieš fitopatogeninius grybus tyrimus, bei išsiaiškinti ar išskirtos bakterijos turi augimą skatinantį poveikį.

Tikslo įgyvendinimui iškelti tokie uždaviniai:

1. ištirti iš dirvožemio išskirtas sporas formuojančias rizobakterijas ir identifikuoti jas pagal morfologines ir chemines savybes;
2. ištirti iš dirvožemio išskirtų ir etaloninių *Bacillus spp.* antagonistines savybes prieš fitopatogeninius grybus;
3. palyginti skirtingų inkubavimo temperatūrų (25 °C ir 37 °C) įtaką iš dirvožemio išskirtų ir etaloninių bakterijų antagonistinėms savybėms prieš fitopatogeninius grybus;
4. ištirti pasirinktų *Bacillus spp.* bakterijų augalų augimo skatinimo galimybes.

## **1. Literatūros apžvalga**

### **1.1. Mikroorganizmai randami dirvožemyje**

Atliktos studijos parodė, kad dirvožemis yra pagrindinis organizmų rezervuaras, kuris pasižymi didele biologine įvairove. Dirvožemyje be augalų ir stuburinių organizmų, yra randama bakterijų, grybų, pirmuonių, nematodų, sliekų ir nariuotakojų populiacijos [4,5]. Bakterijos užima svarbią vietą biotoje, nes tai yra pagrindiniai organizmai, dalyvaujantys anglies, azoto, fosforo ar kituose biogeocheminiuose cikluose [6]. Šie ciklai dirvožemio derlingumui yra svarbūs, nes perdirba produktus bei augalus aprūpina maistinėmis medžiagomis. Bakterijos taip pat dalyvauja bioremediacijos procesuose tada, kai dirvožemio užterštumas padidėja. Dėl mažo ląstelių dydžio, jos veikia labai nedideliame dirvožemio plote, todėl yra reikalingas papildomas jų išsklaidymo mechanizmas, tam kad būtų išplėstas bakterijų zonų poveikis dirvožemyje [7].

Bakterijos, kaip ir minėta anksčiau, yra dažniausiai pasitaikančios mikroorganizmų kultūros dirvožemyje. Jų pagrindinis tikslas yra ekosistemos palaikymas dirvožemyje, dirvožemyje esančių maisto medžiagų perdirbimas, praturtinimas mineralais, azoto fiksacija, dirvožemio biogeocheminių savybių gerinimas, visi šie aspektai yra būtini, norint užtikrinti sklandžią augalininkystę [8].

### **1.2. Bendra dirvožemio struktūra**

Smėlis, dumblas, molis ir kietosios mineralinės dalelės, kartu su vandeniu, oru ir organinėmis medžiagomis prisideda prie dirvožemio susidarymo. Anglies dioksidas padeda dirvožemyje esančiam vandeniui tirpdyti mineralines daleles ir išskiria maistines medžiagas, kurias augalai gali lengviau įsisavinti. Organinių ir maistinių medžiagų ciklas yra skatinamas augalų ir dirvožemio organizmų, kurie leidžia gyvybei toliau vystytis dirvožemyje. Dirvos klestėjimas yra būtinas veiksnys, kuris lemia agrokultūros išgyvenamumą [9]. Konkretaus dirvožemio gebėjimas palaikyti augalų ir gyvūnų produktyvumą yra tai, ką mokslininkai įvardina kaip kokybišką dirvožemį [10]. Toks dirvožemis pasižymi didesne pasėlių išeiga, dėl lengvesnio šaknų išplitimo, vandens patekimo ir užsilaikymo dirvoje, maistinių medžiagų prieinamumo, kenksmingų cheminių medžiagų nebuvimo, naudingų organizmų egzistavimo, ir geresne kokybe. Minėti naudingi organizmai prislopina kitus, žalą darančius, mikroorganizmus, tuo pačiu skatindami augalo augimą. Aeravimas ir drenavimas taip pat prisideda prie bendro dirvožemio kokybės gerinimo. Šaknų funkcionavimui, maistinių medžiagų ir vandens įsisavinimui bei pasėlių išeigai labai didelę įtaką turi deguonies koncentracija, esanti dirvožemyje. Užlietuose dirvožemiuose pasireiškia deguonies anoksija, kuri neigiamai veikia augalų sveikatą ir gali juos pražudyti. Dirvos aeracija yra būtina norint palaikyti aerobinį dirvožemio kvėpavimą, kadangi deguonis reikalingas ne tik augalų šaknims, bet ir mikroorganizmams.

Kenkėjai yra nepageidaujami agrokultūroje, nes misdami įvairiomis augalo dalimis, užkrečia jį įvairiomis ligomis, kurios padidina nepageidaujamus pasėlių nuostolius [11]. Tačiau yra keletas problemų, kurios daro įtaką dirvožemio kokybei, tai: dirvožemio erozija, organinių medžiagų praradimas, maistinių medžiagų disbalansas, rūgštingumo, druskos koncentracijos padidėjimas, užterštumas, patvinimas ir biologinės įvairovės nykimas. Taip pat yra įvardijama kita problema - dirvožemio sutankėjimas, dėl kurio atsiranda mažiau erdvės, tarpai susispaudžia ir didesniems dirvožemio organizmams judėjimas arba išlikimas tampa nebeįmanomas. Kita dažna problema yra dirvožemio denitrifikacija. Ji dažniausiai pasireiškia, kai perteklinis vanduo susikaupia dirvos viršuje, be galimybės susigerti giliau į dirvožemį [11,12].

Fitopatogeniniai toksinai yra ne iš fermentų sudaryti junginiai, išskiriami augalų patogenų metabolizmo metu, kurie yra kenksmingi augalams [13]. Šios toksinės medžiagos, sutrikdo natūralius augalo fiziologinius procesus, net esant labai mažoms koncentracijoms. Fitopatogeninių grybų išskiriami toksinai daro labai didelę neigiamą įtaką augalų vystymuisi [14]. Mažos molekulinės masės antriniai metabolitai sudaro daugumą fitopatogeninių toksinų medžiagų, kurios sukelia šias ligas: kviečių stiebo rudoji rūdė (*Puccinia triticina*), sklerotinis puvinys (*Sclerotinia sclerotiorum*), miltligė, rizoktonoizė (*Rhizoctonia solani*), bakterinė dėmėtligė, chlorozė (*Pseudomonas syringae*) [15].

### 1.3. Patogeniniai grybai, jų sukeltos ligos ir kontrolės metodai

Didžioji dalis patogeninių grybų yra aerobai. Norint, kad grybai galėtų efektyviai augti ir daugintis, jiems yra reikalingos azoto, mineralų ir anglies turinčios medžiagos. Grybai auga nuo 3 iki 10 pH, geriausios sąlygos jiems augti yra 6,5 pH terpėje. Optimali dauginimosi ir augimo temperatūra svyruoja apie 25-33 °C. Įprastai patogeniniai grybai nesintetina egzotoksinų. Šeimininko organizme jie sužadina hiperreaktyvumo reakcijas dėl sensibilizacijos jų antigenais. Taip pat šie grybai sukelia ligų grupę vadinamą mikotoksikoze. Jomis susergama, kai į organizmą patenka mikroskopinių pelėsinių grybų gaminami mikotoksinai. Yra nustatyta, jog tik apie 20 mikotoksinų yra pavojingi kaip maisto teršalai. Iš jų labiausiai toksiški ir labiausiai paplitę yra aflatoksinai, B1, B2, G1, G2, M1, taip pat trichoteceno mikotoksinai, ochratoksinai, citrininas, citreoviridinas, skalsės alkaloidai. Kai kurios *Aspergillus spp.* rūšys gamina toksinus, kurie veikia kaip kancerogenai, tačiau jie nėra kaupiami organizmo viduje, o išskiriami į aplinką [16]. Patogeniniai grybai yra vienas iš pagrindinių veiksmų keliančių pavojų augalams, dėl kurių pasėlių išeiga sumažėja 65 proc. [17]. Šių patogenų egzistavimas taip pat prisideda prie apdulkintojų praradimo, dėl kurio yra patiriami dar didesni nuostoliai visoje žemės ūkio veikloje [18,19].

#### 1.3.1. Mikotoksinai

Pagal apibrėžimą, fuzariniai mikotoksinai yra antriniai metabolitai, kuriuos išskiria patogeniniai grybai. Dažniausiai *Fusarium spp.* užkrečia kelis augalus vienus metu. Jau prieš nuimant derlių, užkrėstuose *Fusarium graminearum* patogenu miežiuose, avižose ir kviečiuose yra susidarę dideli mikotoksinų kiekiai. Dažniausiai susidarantios grupės yra zearalenonai, fumonizinais ir trichotecenais. Kiekvienas iš šių išvardintų mikotoksinų turi toksiškų savybių augalų atžvilgiu. Viena patogeninių grybų rūšių gali išskirti keletą skirtingų mikotoksinų, pavyzdžiui – *F. graminearum* išskiria 3-ADON (acetildeoksinivalenolis), 15-ADON (15-acetildeoksinivalenolis), kulmoriną, deoksinivalenolį, nivalenolį ir zearalenoną [20]. Aplinkos sąlygos, tokios kaip temperatūra, substratas, inkubacijos trukmė, turi įtakos mikotoksinų išskiriamam kiekiui [21].

#### 1.3.2. Fuzariozė

Fuzariozė yra viena iš daugiausiai žalos padaranti augalų liga, kurią sukelia *Fusarium* kilmės mikromicetai. Fuzariozė efektyviausiai veikia vietovėse, kur yra aukšta temperatūra ir didelė drėgmė. Kai šie mikrogyvai pažeidžia sėklas, jos pradeda pūti, o išaugę daigai dažniausiai būna ploni ir gelsvos spalvos. Patogenas naudodamasis savo sporomis arba miceliu užkemša vandens indus esančius augalo šaknyse ir sutrikdo vandens įsisavinimą. Praskyrus augalo stiebą, būna aiškiai matomas spalvos pakitimas – parudavimas, kas indikuoja, jog augalas buvo užkrėstas. Lietuvoje šis patogenas plinta įvairiais būdais, tačiau nustatyta, kad dažniausiai augalai užsikrečia per dirvožemį, iškart po to kai augalas būna pasodintas. Aukšta temperatūra ir drėgmė, didelis deguonies kiekis

sudaro idealias sąlygas *Fusarium spp.* mikromicetams augti. Fuzariozė pasireiškia varpų spalvos pakitimais, dažniausiai švelniai gelsva, balta spalva, grūdai būna išdžiūvę, baltos ar švelniai rausvos spalvos [22].

### 1.3.3. *Fusarium graminearum*

*Fusarium graminearum* dažniausiai užkrečiami smulkiagrūdžiai javai (kviečiai, miežiai, avižos). Vienas iš šių *Fusarium* genties grybų privalumų yra gebėjimas gaminti mikotoksinus dideliais kiekiais. *Fusarium spp.* yra gerai išsivystę, atskiri, nepigmentuoti hifai, sudarantys makrokonidijas, kurių forma, dydis ir skaičius įvairiose rūšyse skiriasi. Šiems patogeniniams grybams taip pat yra būdingos mikrokonidijos, kurios susidaro tik oriniame micelyje. Dažniausiai jos susidaro ant linijinių ar šakotų konidijakočių [23]. *F. graminearum* patenka į augalo organizmą per šaknų epidermį. Ankstyvajame laikotarpyje augalas neparodo jokių simptomų, jog yra užkrėstas *F. graminearum* grybeliu, tačiau po kurio laiko pirmieji požymiai atsiranda šaknų ir stiebo srityse [24]. *F. graminearum* gali išgyventi žiemos laikotarpį dirvožemyje arba augalų liekanose makrokonidijų pavidalu ir pavasarį prasideda naujas infekcijos ciklas [25]. Šio grybo optimali augimo temperatūra yra 25 °C, tačiau gali augti ir žemesnėse nei 5 °C ir iki 35 °C [26].

### 1.3.4. *Fusarium avenaceum*

Daugelį ligų, tokių kaip kviečių, miežių ir kukurūzų fuzariozė, taip pat ir ankštinių, augalų šaknų, rapsų puvinį bei bulvių sausąjį puvinį, sukelia visame pasaulyje žinomas grybelinis patogenas – *Fusarium avenaceum* [27]. Šis patogeninis grybas gali labai stipriai pakenkti derliaus išėgai. Kadangi jis išskiria įvairius kenksmingus antrinius metabolitus ir medžiagas skaidančius fermentus bei kelia labai didelį pavojų ekonomikos atžvilgiu svarbiems ūkio augalams [28]. *Fusarium avenaceum* gali būti traktuojamas kaip stiprus patogenas arba silpnas parazitas, kuris geba prisitaikyti prie skirtingų rūšių šeiminių ir prisideda prie augalų ligų plitimo visame pasaulyje. Nors šis patogenas labiausiai paplitęs vidutinių platumų klimato regionuose, tačiau randamas ir poliariniuose bei subpoliariniuose regionuose [29]. *Fusarium avenaceum* augimo spektras gali varijuoti tarp -3 ir 31 °C, tačiau optimaliausia augimo temperatūra yra apie 25°C [30].

### 1.3.5. *Aspergillus flavus*

*Aspergillus* gentį sudaro daugiau nei 300 skirtingų rūšių, kurios gali būti suskirstytos į 19 grupių [31]. Tarp jų grybų rūšys, priklausančios *Aspergillus* grupei *Flavi*, turi didelę reikšmę žemės ūkiui, biotechnologijų sričiai, maisto pramonei bei žmonių sveikatai [32]. Viena iš pavojingiausių gamtos kancerogenų – aflatoksiną – išskiria *Aspergillus flavus* grybas. Jis dažniausiai pasireiškia kukurūzų ir žemės riešutų derliaus nuėmimo metu, kas lemia didelius tiek pasėlių, tiek finansinius nuostolius [33,34]. Taip pat, *A. flavus* yra antras pagal dažnumą invazinės aspergiliozės sukėlėjas, kartu su kitomis *Flavi* skyriui priklausančioms rūšims, gamina ir išskiria įvairius mikotoksinus, kurie turi žalingą poveikį žmogaus sveikatai [32,35,36]. Pagrindinis *Aspergillus* genties rūšių dauginimosi būdas yra sporų gaminimas ir jų paskleidimas į aplinką. Dažniausiai yra išskiriamos konidijos – nelytinės sporos, tačiau kai kurios *Aspergillus* rūšys išskiria lytines sporas ir jomis dauginasi [37]. Priešingai nei hifai, konidijos turi storą ląstelės sienelės struktūrą, kuri yra atspari įvairioms aplinkos sąlygoms ir apsaugo nuo šeiminingo organizmo imuninės sistemos [37,38]. Konidijose yra įvairių antrinių metabolitų, tokiu kaip melaninas ir mikotoksinai, kurie dalyvauja patogenezėje ir vystymosi stadijose [39]. Skirtingai nuo daugelio grybų, *Aspergillus flavus* propaguoja aukštos ir sausos

aplinkos sąlygas. Optimali augimo temperatūra yra 37 °C, tačiau grybelis lengvai auga ir 12-48 °C [40].

#### **1.4. Dirvožemyje randamų *Bacillus spp.* bakterijų apibūdinimas ir jų pritaikymas skirtingose srityse**

*Bacillus* genties bakterijų ląstelės yra lazdelės formos, tiesios arba šiek tiek lenktos, atsirandančios pavieniui arba poromis, kur kurios grandinėmis, o kartais ir kaip ilgi siūlai. Ląstelėje susidaro ne daugiau kaip viena endospora, šios sporos turi labai didelį atsparumą daugeliui nepalankių sąlygų. *Bacillus spp.* dažniausiai yra gram-teigiamos arba gram-teigiamos tik ankstyvosiose vystymosi stadijose [41]. Bakterijos taip pat apibūdinamos kaip aerobinės arba fakultatyvinės aerobinės, tačiau būna atvejų, kuomet jos gali būti tik anaerobinės. Dauguma *Bacillus* genčių auga ant įprastų terpių, tokių kaip maistinių medžiagų (nutrient agar) ir kraujo agaras. Lyginant *Bacillus spp.* rūšių kolonijas, jų morfologija yra skirtinga. Šios rūšies bakterijos pasižymi plačiais fiziologiniais ypatumais, tokiais kaip – psichofiliniais, termofiliniais, acidofiliniais bei šarminiais. Kai kurios padermės gali būti labiau tolerantiškos druskingumui, o kitos - halofilinės. Dauguma *Bacillus spp.* rūšių išskiria katalazę [41].

Per pastarąjį dešimtmetį bakterijų *Bacillus subtilis* pritaikymas pramonėje sparčiai išaugo ir jos tapo viena iš pagrindinių žaliavų daugeliui pramonėje naudojamų produktų [42,43]. Pastarieji apima baltymus [44], heterologinius baltymus [45], antibiotikus [46], vitaminus ir aminorūgštis [47]. *Bacillus subtilis*, taip pat išskiria chemines medžiagas, kurios gali būti pritaikytos ir kitose srityse, pvz.: maisto, kosmetikos, cheminių medžiagų ar vaistų pramonėje, taip pat gaminant pašarus gyvuliams. Ši bakterija išskiria įvairius mažos molekulinės masės antimikrobinius peptidus ir bakteriocinus, tokius kaip surfaktiną, baciliziną ir subtiliną, kurie, kaip nustatyta, turi teigiamą poveikį maisto, agrokultūros pramonėje, taip pat ir biomedicininės inžinerijos srityje. *B. subtilis* antimikrobiniai peptidai yra perspektyvios terapinės priemonės, kurios dėl savo plataus ir greito aktyvumo sugeba veikti prieš įvairius patogenus [48,49].

#### **1.5. Mikroorganizmai kaip biotrašos**

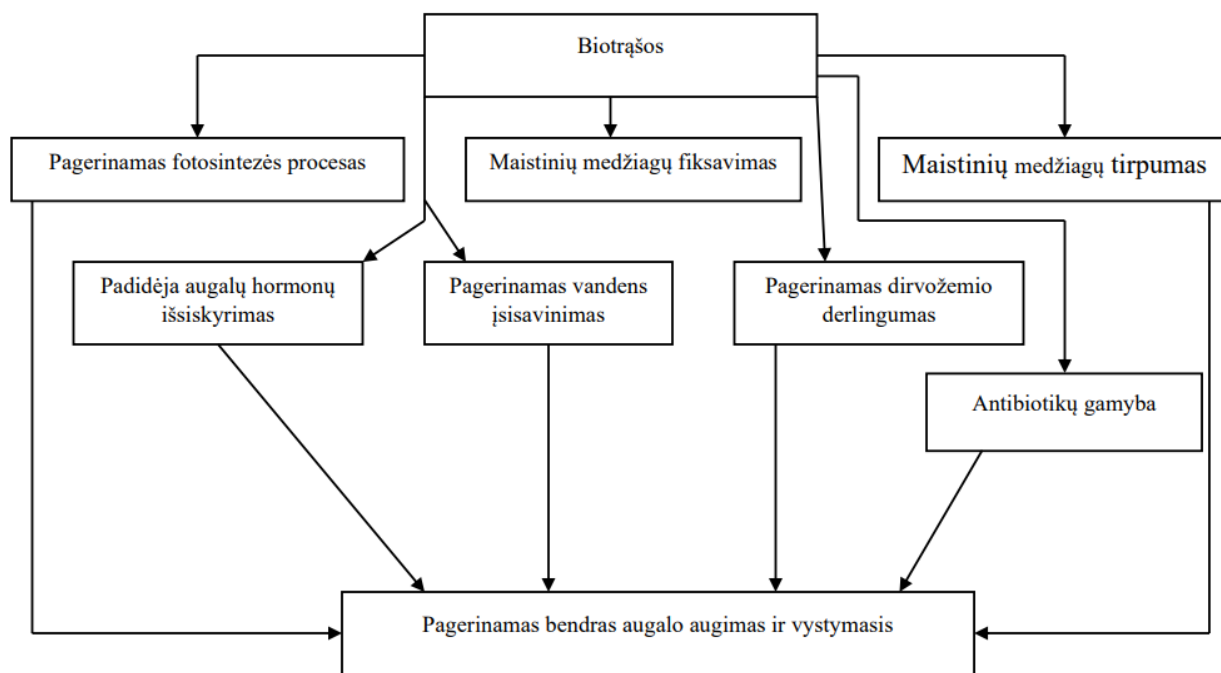
Buvo padaryta didelė pažanga, siekiant agrokultūroje pritaikyti ekologiškesnius ir mažiau kenksmingus žemės ūkio produktus, tokius kaip biopesticidai ir biologinės trašos. Esant optimalioms sąlygoms, biotrašos gali būti inokuliuojamos ant sėklų ir įvairių agrokultūros augalų šaknų ar tiesiogiai purškiamos ant dirvožemio [50]. Biotrašos susidaro iš didelio kiekio gyvų mikroorganizmų, kurie patekę ant sėklos, augalo paviršiaus ar dirvožemio, pagerina maistinių medžiagų prieinamumą ir skatina augalų vystymąsi [51]. Jos papildo dirvožemį maistinėmis medžiagomis natūralių procesų pagalba - fiksuojant atmosferinį azotą, tirpinant fosforą, atliekant medžiagų, skatinančių augalų augimą, sintezę [52,53].

Augalo rizosfera, tai glausta dirvožemio zona, kuri yra aplink augančio augalo šaknų sistemą. Ją kolonizuoja platus įvairių mikroorganizmų spektras, kurio didžiausią dalį sudaro bakterijos bei grybai [54]. Augalo augimą skatinančios rizobakterijos yra laisvai gyvenančios dirvožemio bakterijos, kurios klesti rizosferoje, kolonizuoja augalo šaknis ir skatina efektyvesnę augalo vystymąsi, išskiriant didelę junginių įvairovę aplink augalo šaknis [55,56].

Bakterijos ir grybai, gyvenantys rizosferoje, gali veikti kaip biotrašos, kurios skatina augalo augimą ir vystymąsi, nes didina biotinio ir abiotinio streso toleranciją bei palaiko augalo visavertę mitybą. Taip pat jie gali atlikti ir biopesticidų funkciją, nes daugelis mikroorganizmų naikina vabzdžius ir

kitus kenkėjus, kurie kelia grėsmę pasėliams. Mikroorganizmai gali skaidyti ir nukenksminti pavojingus organinius junginius, kurie turi polinkį kauptis dirvožemyje po įvairių žemdirbystės veiklų. Jie atlieka naudingą bioremediacinę funkciją tiek dirvožemiui, tiek augantiems augalams [57].

Bakterinės biotrašos - tai grupė bakterijų, kurios padeda sulaikyti įvairias augalų augimui reikalingas maistines medžiagas [58]. Šios biotrašos gali fiksuoti azotą, tirpinti fosforą, kalį ir kitus mikroelementus bei išskirti organinius junginius, kurie slopina augalų patogenus. Literatūroje yra minimos vienos populiariausių biotrašų: *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus* ir kt. rūšių bakterijos [59].



1.1 pav. Biotrašų pritaikymas agrokultūroje [60]

### 1.6. Mikrobinių biopesticidų privalumai ir trūkumai

Augalai jau seniai naudojami šiuolaikinėje farmacijoje, pesticidų gamyboje, tradicinių vaistažolių priemonėse ir kituose dalykuose. Įvairių fitocheminių medžiagų prieinamumas augaluose suteikė žmonėms natūralų būdą kovoti su kenkėjais, kurie prisideda prie žemės ūkio produkcijos mažinimo. Šiais laikais augalinės kilmės produktai, kartais vadinami vaistažolių produktais, yra populiarius visose pramonės šakose – nuo farmacijos iki kosmetikos iki insekticidų. Dėl kelių pranašumų, palyginti su sintetiniais pesticidais, įskaitant biologinį skaidumą, netvarumą ir ekologiškumą, pesticidų pramonė to siekia aktyviau [61,62].



**1.1 lentelė. Biopesticidų privalumai ir trūkumai [63]**

Privalumai	Trūkumai
Netoksiški ir nepatogeniniai gyvūnams ir žmonėms	Mikrobinių insekticidų poveikį sumažina paprasti aplinkos veiksniai, tokie kaip: aukšta temperatūra, dehidratacija, tiesioginė ultravioletinė radiacija (saulės spinduliai)
Veikiamos tikslinės organizmų rūšys	Dauguma biopesticidų yra gyvi organizmai, todėl jų veiksmingumui turi įtakos abiotinių ir biotinių veiksnių svyravimai
Biopesticidai yra biologiškai suyrantys organizmai, kuriems yra nereikalingas papildomas apdorojimas	Reikalingos specialios patalpos biopesticidų laikymui.
Patogeniniai mikroorganizmai gali įsitvirtinti kenkėjų populiacijoje ar aplinkoje ir užtikrinti kontrolę kitose kenkėjų kartose	Limituotas tiekėjų kiekis. Dauguma biopesticidų yra gaminami tik kelių konkrečių gamintojų, dėl sunkiau prieinamų žaliavų.
Skatina naudingą dirvožemio mikroflorą, kartu skatindami ir augalo augimą.	

### 1.7. *Bacillus spp.* ir patogeninių grybų sąveika. Slopinimui išskiriamos medžiagos

Antrinių metabolitų, turinčių antibiotinių savybių, susidarymas yra dažnai siejamas su *Bacillus spp.* antagonistiniu poveikiu. Šie metabolitai susideda iš mažos molekulinės masės peptidų, kurie yra išskiriami ribosimiškai (bakteriocinų atveju) arba neribosomiškai (lipopeptidai, peptidai, poliketidai). Dauguma bakterijų gamina peptidus, dar žinomus kaip bakteriocinus, kurie pasižymi dideliu atsparumu antibiotikams ir patogeninėms bakterijoms [64]. Slopindami naujų ląstelių sienelių sintezę ar sudarydami poras ląstelės membranoje, bakteriocinai gali veikti tikslines ląsteles ar jų dalis [65]. Bakteriocinai turi nedidelį aktyvumo spektrą ir paprastai veikia tikslines rūšis, kurios savo antibakteriniais procesais, yra identiškos arba beveik panašios į gamintojus. Nepaisant to, *Bacillus spp.* gaminant bakteriocinus, demonstruoja platų antibakterinio poveikio spektrą [66]. Remiantis atliktais tyrimais, nustatyta, kad izoliuotos *Bacillus spp.* genties bakterijos (*B. subtilis*, *B. cereus* ir *B. coagulans*) išskiria bakteriocinus ar į bakteriocinus panašias medžiagas - BLS (angl. bacteriocin like substances) (amilolizinas, amizinas, subtilinas, subtilozinas A, subtilozinas B ir tiricinas) [67]. Biologinei kenksmingų bakterijų kontrolei gali būti naudingas ir bakteriocinų bei BLS išskyrimas ir nustatymas. Nepaisant to, *Bacillus spp.*, kurie gamina peptidus ir lipopeptidus, kurių negamina ribosomos, turi daug didesnę antibakterinį poveikį [68]. Plačiausiai ištirti antibiotikų junginiai *Bacillus spp.* yra cikliniai lipopeptidai, kurie yra gerai žinomi dėl savo antagonistinio poveikio įvairiems augalų patogenams [69]. Pirminį lipopeptidų veikimo mechanizmą sudaro patogeninių taikinių, esančių ant ląstelės sienelės, sąveika. Ji sukelia struktūros ir pralaidumo pokyčius, kurie sutrikdo jonams laidžių porų tirpumą ir formavimąsi [68].

#### 1.7.1. Fermentų sintezė

Antimikrobiniam *Bacillus spp.* efektyvumui turi įtakos hidrolizinių fermentų sintezė, kurios metu bakterija išskiria fermentus, tokius kaip chitinazę, chitozanazę, gliukanazę, celiulazę, lipazę ar proteazę, kurie efektyviai hidrolizuoja grybų ir bakterijų ląstelių sienelių komponentus. Chitinazę

(EC 3.2.1.14) yra glikozidų hidrolazės (GH), kurios skaido  $\beta$ -1,4-glikozidines jungtis chitine, antrame gausiausiame natūraliai prieinamame polisacharide po celiuliozės ir pagrindiniame grybo ląstelės sienelės komponente [70]. Kad bakterijos galėtų skaidyti chitiną ir naudoti jį kaip energijos šaltinį, jos išskiria chitinazę. Kai kurios bakterinės chitinazės - perspektyvios biologinės kontrolės priemonės, apsaugančios augalus nuo įvairių fitopatogeninių grybų sukeltamų ligų [71,72].

Chitozanazė (E.C. 3.2.1.132) yra GH, kurios katalizuoja iš chitino kilusio chitozano  $\beta$ -1,4-glikozidines jungtis [73]. Kadangi chitozanas taip pat aptinkamas grybų ląstelių sienelėse, chitozanazę išskiriančios *Bacillus spp.* gali būti taikomos kaip biologinės kontrolės priemonės, kad apsaugotų augalus nuo patogeninių organizmų [74].

Gliukanazė yra GH, kurios hidrolizuoja glikozidinius ryšius, esančius  $\alpha$ -gliukanuose ir  $\beta$ -gliukanuose.  $\alpha$ -1,3- gliukanas nėra labai svarbus sienelės komponentas, bet atlieka svarbią funkciją tam tikrose grybų ląstelių atsiskyrimo ir vegetatyvinio augimo stadijose [75], o  $\beta$ -1,3-gliukanas yra antra po chitino pagal svarbą grybinių ląstelių sudedamoji medžiaga [76]. Pagrindinę struktūrinę funkciją grybuose atlieka gliukanai, tačiau jie taip pat gali būti skaidomi ir naudojami kaip maistinė medžiaga. *Bacillus spp.* yra praturtintos  $\alpha$ -1,3-gliukanazės (EC 3.2.1.84) ir  $\beta$ -1,3-gliukanazės (EC 3.2.1.39). Anksčiau minėti fermentai dažniausiai išskiriami iš *Bacillus brevis*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. circulans* ir *B. halodurans* [77].

Be chitino ir gliukanų, grybo sienelių griaučiuose taip pat aptinkama celiuliozės, lipidų ir baltymų. Bakterinė celiuliozė, lipazė bei proteazė atlieka svarbią funkciją ląstelės sienelės lizėje, kuri vyksta patogeno ir *Bacillus* bakterijų sąveikos metu. Sėkmingas ląstelės sienelės irimas priklauso nuo daugiau nei vieno iš fermentų aktyvumo. Chitinazės fermentų aktyvumas nustatomas geresnis arba toks pats kaip ir kitų fermentų, ypač gliukanazių aktyvumu. Norint pasiekti didžiausią našumą, yra reikalingi hidroliziniai fermentų mišiniai su papildomo veikimo režimais, o panaudojus teisingas fermentų mišinių kombinacijas, jų tarpusavio sąveika gali padidinti priešgrybelinį aktyvumą [77].

Kai kurios grybų ir vabzdžių rūšys parazituoja įvairių rūšių augalus, tarp kurių patenka ir agrokultūros augalai. *Bacillus* genties bakterijų mechanizmas yra išskirtinis, kurio dėka yra išskiriami antriniai metabolitai, lizocimo fermentai ar toksinai, kurie apsaugo nuo fitopatogenų sukeltamų augalų ligų ir tuo pačiu skatina augalo augimą [78]. Yra pastebėta, kad pritaikant įvairius *Bacillus* genties bakterijų biopesticidus prieš grybelinės kilmės ligas yra sukuriama perspektyva žemės ūkio biotechnologijų tobulėjimui. Šie mikroorganizmai pagerina dirvožemio ir padidina derliaus bei pasėlių kokybę. Taip pat buvo ištirta ir daugiau *Bacillus* genties bakterijų, kurios buvo pritaikytos komercinei biopesticidų gamybai.

## 1.2 lentelė. Bakterijų charakteristikos [79]

<i>Bacillus spp.</i>	Veiklioji medžiaga	Tikslinis veikiamasis patogenas	Augalui sukeliama liga
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Iturinas	<i>Verticilium dahliae</i>	Verticiliozė
<i>Bacillus subtilis; Bacillus amyloliquefaciens</i>	Iturinas, surfaktinas, fengicinas	<i>Fusarium graminearum</i>	Varpų fuzariozė
<i>Bacillus spp., Bacillus amyloliquefaciens</i>	Surfaktinas, iturinas, fengicinas, sideroforas	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Baltasis (sklerotinis) puvinys
<i>Bacillus pumilus, Bacillus amyloliquefaciens</i>	Lipopeptidai	<i>Pseudomonas syringae pv. aptata</i>	Cukrinių runkelių bakterinė dėmėtligė
<i>Bacillus subtilis</i>	Iturinas, surfaktinas, plipastatinas, bacilomicinas, difucidinas	<i>Gaeumannomyces graminis var. tritici</i>	Kviečių javaklupė
<i>Bacillus subtilis</i>	Chitinazė	<i>Rhizoctonia solani</i>	Stiebo auglys ir bulvių žiedinis puvinys
<i>Bacillus subtilis</i>	Sideroforai, liziniai fermentai	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Kviečių lapų dėmėtligė

Antagonistiniai metabolitai, kuriuos sekretuoja *Bacillus spp.*, apima lipopeptidines paviršinio aktyvumo medžiagas, tokias kaip surfaktinas, fengicinas ir iturinas, kurie yra stipriai veikiantys biofungicidai. Šios biotrašos buvo naudojamos keliuose pasėliuose nuo grybelinių augalų patogenų, tokių kaip, *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum* ir kt. *Bacillus spp.* išskiriami lizocimo fermentai, tokie kaip chitinazė,  $\beta$ -1,3-gliukanazė,  $\beta$ -gliukozidazė, lipazė ar proteazė sugeba suardyti grybelio ląstelės sienelės komponentus (chitiną,  $\beta$ -gliukanus ir baltymus).

Kaip ir minėta anksčiau, *Bacillus* gentis yra puikus cheminių junginių šaltinis, kurių skirtingi poveikiai suteikia augalui teigiamų savybių. Tačiau yra keli veiksniai, lemiantys antrinių metabolitų išsiskyrimą, kurie dėl daromų junginių įtakos, padeda geriau suprasti jų svarbą derliui ir agrokultūrai. Abiotiniai veiksniai, tokie kaip temperatūra, pH ir deguonies prieinamumas buvo tiriami studijose bei vertinami, kurie iš jų turi didžiausią įtaką metabolitų gamybai su augalais susijusiuose mikroorganizmuose [80]. Biotiniai veiksniai, taip pat atlieka svarbią funkciją. Pavyzdžiui rizosferos formavimuisi yra būtini eksudatai, kurie aprūpina maistinėmis medžiagomis su augalais susijusias bakterijas. Tačiau *Bacillus spp.* genties bakterijos, esančios rizosferoje turi konkuruoti su kitais mikroorganizmais, išskiriančiais metabolitus, tam, kad galėtų pačios išskirti medžiagas kovai prieš grybelinius mikroorganizmus [81]. Svarbu pabrėžti tai, kad kartais *Bacillus* bakterijų sąveika su kitais mikroorganizmais sudaro sinergetinį efektą, siekiant apsaugoti augalus nuo patogenų, kartu skatinant augalo augimą ir gerinant jo sveikatą.

## 1.8. *Bacillus spp.* kaip augalų augimo skatintojas

Šiuo metu pasaulyje susiduriama su dideliu poreikiu sukurti ekologiškus ir patvarius metodus, skirtus žemės ūkio produktyvumui gerinti. Pagrindinį pavojų kelia mikrobinės augalų ligos, kurios didžiausią įtaką daro klestinčioms ekosistemoms ir pasauliniams maisto ištekliams. Manoma, kad dėl augalų patogeninių bakterijų visame pasaulyje kasmet pasėlių išeiga sumažėja apie 25 proc. [82]. Norint patenkinti augančios žmonių populiacijos maisto poreikį, yra reikalingi nauji metodai, kurie padidintų žemės ūkio pramonės efektyvumą. Šiuolaikinėje agrokultūroje, naudojamos agrocheminės medžiagos, tokios kaip pesticidai ar trąšos, turi labai daug neigiamos įtakos tiek aplinkai, tiek žmonių sveikatai [83]. Buvo atlikti tyrimai, kuriais siekiama atrasti naujų bakterijų padermių, naudojamų kaip biotrąšos vietoj cheminių medžiagų agrokultūroje. Siekiant užtikrinti gerą augalų būklę, pirmenybė buvo teikiama kelioms bakterijų gentims - *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.* ir *Streptomyces spp.* Buvo nustatyta, kad rizobakterijų padermės kaip *Bacillus spp.* išskiria auksiną, ciano vandenilį ir amoniaką, taip pat toleruoja abiotinį stresą ir tirpiną fosfatą [84]. Inaktyvuodami virulentiškumo faktorius, jie skatina augalų apsaugos mechanizmus ir antibiotzę. Buvo nustatyta, kad pagrindinis biopesticidų šaltinis yra aktinomicetai [85].

### 1.8.1. *Bacillus spp.* išskiriami fitohormonai

Buvo nustatyta, kad kelios *Bacillus spp.* išskiria fitohormonus, tokius kaip auksiną, gibereliną, citokininą ar absciso rūgštį, kurie atlieka atitinkamas funkcijas augalo viduje, paveikdami jų šaknų bei ląstelių padidėjimą ir dalijimąsi [86]. Stebint pasėlių ar bulvių kultūrų šaknų padidėjimą buvo nustatyta, kad keli *Bacillus* bakterijų genai dalyvauja 3-indolilacto rūgšties (IAR) biosintezės kelyje [87,88]. Citokininai ir giberelinai, išskiriami kelių *Bacillus* genties padermių, kurie taip pat tiesiogiai skatina augalo augimą. Abscisino rūgštis dalyvauja augalų reakcijose į abiotinį stresą (sausrą, temperatūrų kaitą, druskingumo padidėjimą ir kt.) [86]. Tiriant skirtingas *Bacillus* genties bakterija, buvo nustatyta, kad trys fitohormonai, kurie yra tiesiogiai susiję su gynybos atsaku į biotinį stresą, pavyzdžiui, salicilo rūgštį, daugiausia prieš biotrofinius patogenus, ir jazmono rūgštį bei etileną - prieš nekrotrofinius patogenus ir kenkėjus. Šie trys fitohormonai tiesiogiai sąveikauja su šaknų audiniais ir gali sukelti gynybinę reakciją nuo ateityje galimų kenkėjų puolimo, pasitelkdami sisteminio atsparumo mechanizmą [89].

- Auksinai ir citokininai – skatina augalo augimą (ląstelių ilgėjimą), didina atsparumą sausrai, stimuliuoja šaknų formavimąsi;
- Giberelinai – skatina augalo augimą, didina sėklų daigumą ir toleranciją druskingumui, pagerina maistinių medžiagų įsisavinimą, pagerina termotoleranciją;
- Absciso rūgštis – pagerina atsparumą druskingumui, sausrai ir kadmiui.
- Jasmono ir salicilo rūgštis – skatina augalo augimą, padidina atsparumą druskingumui.

## 1.9. Praktinis biotrąšų pritaikymas

Organizmai, esantys rizosferos zonoje, yra naudingi dirvožemiui, nes jie suteikia apsaugą nuo jame esančių antagonistinių bakterijų ir ligų sukėlėjų. Yra du pagrindiniai sukeliama atsparumo tipai, kurie pasireiškia reaguojant į mikroorganizmų signalus: įgytas arba sukeltas sisteminis atsparumas. Pastarasis yra rezultatas, kai augalų šaknys yra veikiamos rizobakterijų, skatinančių jų augimą. Tyrimo metu buvo ištirti augimą skatinantys mikroorganizmai, tokie kaip bakterijos ar grybai, kurie gali būti pritaikomi augalams kaip itin veiksminga stresą mažinanti priemonė. Stresas augalams

atsiranda, kai dirvožemyje pasireiškia organinių medžiagų trūkumas, sausra ar per didelis druskos kiekis, kas sukelia biologinio aktyvumo sumažėjimą [90].

Viena iš pagrindinių problemų, su kuria susiduriama bandant pritaikyti biotrašas komercinei rinkai yra ta, kad iki šiol biotrašos buvo naudojamos tik laboratorinėmis ar šiltnamio sąlygomis. Bandant jas pritaikyti didesniu mastu, t.y., naudojant pramoninėje agrokultūroje, rezultatai dažnai nesutampa. Tokių rezultatų galima priežastis yra ta, jog pasėliai, augantys natūralioje aplinkoje dažnai susiduria su nuolat besikeičiančiomis aplinkos sąlygomis. Temperatūros, kritulių nepastovumas, pasėlių ar dirvožemio įvairovė yra sąlygos, dėl kurių gaunami skirtingi rezultatai naudojant tas pačias biotrašas. Tai yra viena iš pagrindinių priežasčių, dėl kurios ūkininkam nepavyksta lengvai pritaikyti šių biotrašų [90].

Norint suprasti tikslų jų veikimą, slopinant kai kurias patogenines ligas ar augalų imuniteto susidarymui, reikia žinoti mechanizmus, turinčius įtakos antrinių metabolitų susidarymui. Kitas svarbus aspektas, į kurį būtina atkreipti dėmesį, yra galiojimo laikas. Biotrašos yra sudarytos iš gyvų mikroorganizmų, kurių tinkamumo naudoti laikas yra ribotas – apie 3-6 mėnesiai 20-25°C temperatūroje. Šių gyvų mikroorganizmų transportavimas ir laikymas yra taip pat svarbūs veiksniai, lemiantys jų efektyvumą, todėl tai turi būti atliekama atsakingai, tai reikalauja papildomos priežiūros ir atsargumo, dėl ko atitinkamai ir didėja produkto kaina. Taip pat yra susiduriama su produktų registravimu reglamentuose, nes nėra augalų biotrašų ar augalų biostimuliatorių reglamentuojamojo apibrėžimo, dėl ko šis procesas tampa sudėtingesnis ir reikalaujantis daugiau laiko [91].

Buvo nustatyta, kad dėl didelio *Bacillus spp.* bakterijų produktų potencialo tapti biologine trąša arba priemone kontroliuoti tarp augalų plintančias ligas, jos buvo sėkmingai pritaikytos komercinėje gamyboje. *Bacillus spp.* rūšies bakterijos išskiria platų spektrą antrinių metabolitų, kurie atlieka daug įvairių funkcijų, apsaugant pasėlius ir gerinant jų augimo rodiklius. Tačiau svarbu paminėti, jog šie išskiriami metabolitai taip pat gali būti išskirti ir iš įvairių kitų mikroorganizmų, tačiau labai nedideliais kiekiais, dėl to yra sudėtinga išsiaiškinti jų struktūrų ypatumus ar biologinį aktyvumą tiek *in vitro*, tiek *in vivo*. Susidūrimas su šiomis problemomis, skatina naujų technologijų kūrimą [92].

Pagrindinis biotrašų platinimo būdas yra įprasti nešiklio pagrindu pagaminti inokuliantai, kurių privalumas - pigesnis ir paprastesnis pritaikymo būdas. Geriausios biotrašų nešiklių medžiagos turi būti pigios, vietinės ir lengvai prieinamos bei paprastai apdirbamos. Jos taip pat turėtų būti netoksiškos, organiškai skaidžios medžiagos. Gaminant kokybiškas biotrašas, dažniausiai pasirenkami nešikliai yra durpės, vermikulitas, medžio anglis ar galvijų mėšlas. Tačiau šių medžiagų kombinacijos turi kelis trūkumus: sutrumpėja galiojimo laikas, padidėja jautrumas temperatūrai, galima kryžminė tarša dėl kurios sumažėja tiek mikroorganizmų kiekis, tiek veiksmingumas [93].

### **1.9.1. Skystos biotrašos**

Skystos biotrašos yra naudojamos kaip sausos biotrašų biomasės alternatyva [94]. Jų pagrindas yra suspensijos, kurios būna sudarytos iš įvairių polimerų ar mineralinių medžiagų. Skystos biotrašos tampa vis labiau naudojamos lyginant su sausos biomasės trąšomis, dėl jų ilgesnio galiojimo periodo, kuris yra nuo 1 iki 2 metų laikotarpio. Joms taip pat yra nereikalingos papildomos surišimo medžiagos, gali būti naudojamos su modernia technika bei yra atsparios aukštai temperatūrai – iki 45 °C [95]. Skystas biotrašas galima papildyti medžiagomis, kurios skatintų mikroorganizmų padermių augimą. Kaip nurodyta Trishna Mahanty ir kolegų atliktame 2017 metais tyrime, tokias skystas biotrašas galima naudoti dvejopai: tiesiogiai purkšti ant dirvožemio arba sodinti prieš tai suspensijose

išmirkytas sėklas [96]. Vienas didžiausių šių skystų inokuliantų privalumų yra jų didelė koncentracija, todėl yra reikalingi maži kiekiai, lyginant su kietos fazės inokuliantais [97]. Kietosioms biotrašoms durpės yra dažniausiai naudojamas biotrašų nešiklis, kuris dėl savo turimų savybių skatina mikroorganizmų augimą ir išlikimą. Tačiau dėl didelių sterilizavimo sąnaudų, sudėtingumo naudoti dideliuose dirbamuose laukuose ir sudėtingo apdorojimo, skysti inokuliantai buvo sukurti kaip alternatyva kietiems inokuliantams [95].

### **1.10. Literatūros apžvalgos apibendrinimas**

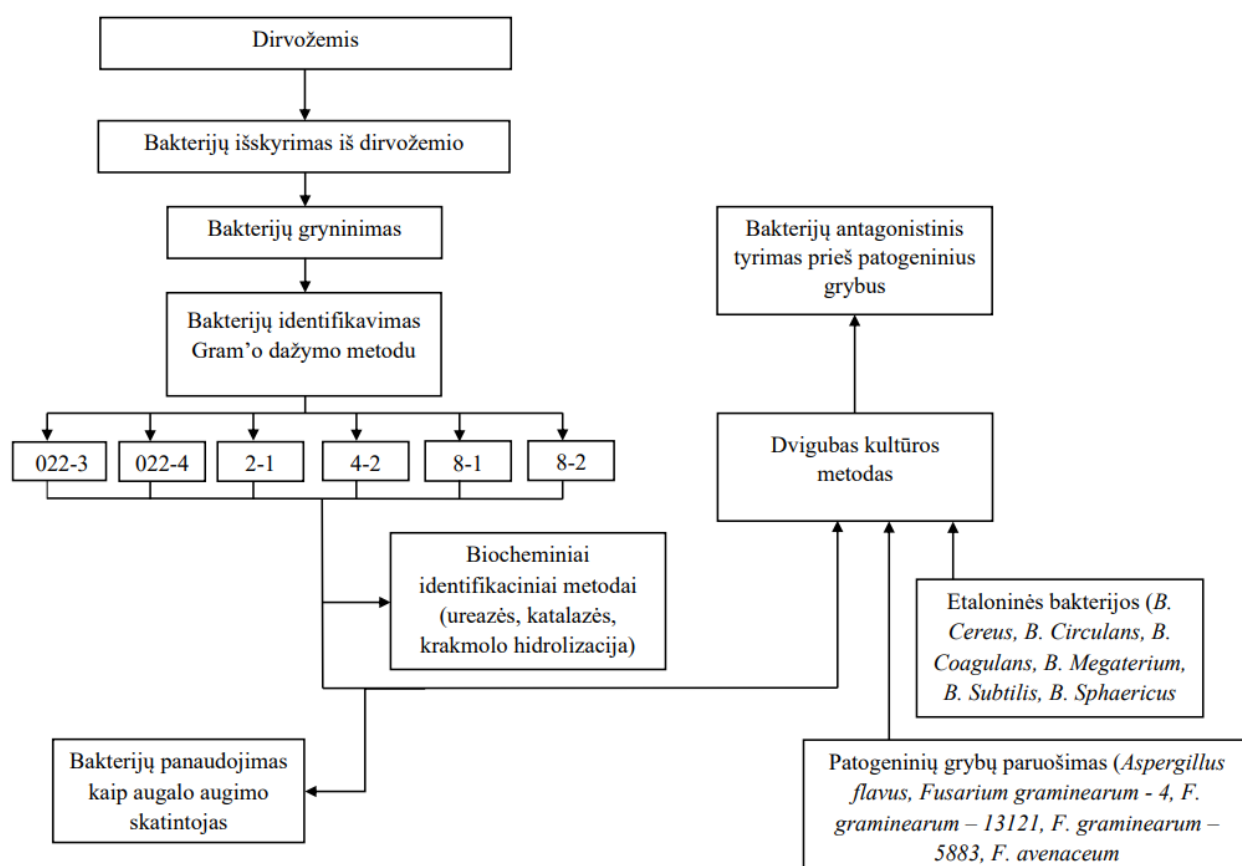
Atsižvelgiant į šiuolaikinės agrokultūros pesticidų ir trąšų sąnaudas, yra aiškiai matoma paklausa biologiškai aktyviems produktams. Dėl savo unikalių savybių, dirvožemyje esantys mikroorganizmai gali būti pritaikyti gaminant biotrašas bei norint apsaugoti augalus nuo nepageidaujamų fitopatogenų. Viena iš literatūroje aprašytų bakterijų rūšių yra *Bacillus spp.* Remiančiais literatūros duomenimis, bioproduktai, gaminami iš šių bakterijų kultūrų, ne tik suteiktų augalams apsaugą nuo užkrečiamų fitopatogeninių grybų ligų, bet ir skatintų augalų fitohormonų sintezę bei didintų produkcijos išėigą. Tačiau svarbiausias šių bioproduktų privalumas – jie yra nekenksmingi aplinkai. Mikrobinės kilmės bioproduktai gali būti gaminami sausos biotrašų biomasės pavidalu arba kaip skystos biotrašos. Sausai biomasei yra reikalingi specialūs nešikliai, tokie kaip durpės, vermikulitas ar kitos granuliu formos trąšos, kai tuo tarpu skystas biotrašas paprasčiau eksploatuoti, jos turi ilgesnį galiojimo laiką bei yra atsparesnės didesnei temperatūrai.

Šio tyrimo metu įvertinta ar *Bacillus spp.* bakterijų kultūros, išskirtos iš dirvožemio, turi įtakos fitopateogeninių grybų augimo slopinimui ir augalų augimo skatinimui.

## 2. Medžiagos ir tyrimų metodai

### 2.1. Pagrindinės tyrimų kryptys ir jų pagrindimas

Tyrimo pradžioje iš skirtingų laukų buvo surinkti dirvožemio mėginiai. Iš dirvožemio mėginių pagal būdingus požymius buvo išskirtos 43 bakterijų kultūros, kurios vėliau buvo gryninamos ir identifikuojamos, kol galiausiai pasirinktos 6 - (022-3, 022-4, 2-1, 4-2, 8-1, 8-2), kurios tarpusavyje skyrėsi savo morfologinėmis savybėmis. Kad įvertinti pasirinktų bakterijų grynumą ir sienelės sandaros ypatumus, jos buvo identifikuojamos dažant Gram'o būdu, vėliau su išskirtomis bakterijomis buvo atlikti biocheminiai identifikaciniai tyrimai, tokie kaip ureazės, katalazės ir krakmolo hidrolizacijos testai. Iš dirvožemio išskirtos ir atrinktos bakterijų kultūros buvo pritaikytos augalų augimo skatinimo tyrime. Pritaikius ir modifikavus dvigubos kultūros metodą, su iš dirvožemio išskirtomis ir laboratorijoje laikomomis etalonišėmis *Bacillus spp.* bakterijų kultūromis buvo atliktas tyrimas, kurio tikslas buvo nustatyti antagonistinių bakterijų poveikį prieš fitopatogeninius grybus ir įvertinti jų slopinimo efektyvumą.



2.1 pav. Principinė darbo schema

### 2.1 lentelė. Tyrime naudota įranga

Pavadinimas	Gamintojas	Kilmės šalis
Vandens vonelė	GRANT INSTRUMENTS	Jungtinė Karalystė
Termostatas	TERMAKS	Norvegija
Binokuliarinis mikroskopas MOTIC SFC-100 FLED	MOTIC	Kinija
Autoklavas Vapormatic 770	MATIC	Italija
Svarstyklės Precisa BJ210C	PRECISA	Swissmade
Vorteksas	MIX ARGOLab	Italija

### 2.2 lentelė. Tyrime naudoti reagentai

Pavadinimas	Gamintojas	Kilmės šalis
NaCl	BDH Chemicals	Jungtinės Amerikos Valstijos
PCA terpė	Liofilhem	Italija
PDA terpė		
Urea agar base (CHRISTENSEN)		
Jautienos sultinio ekstraktas		
Metileno mėlynojo dažas		
Genciano violetinis		
Safraninas		
Žemės ūkio paskirties etilo alkoholis	Stumbras	Lietuva
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Valentis	Lietuva

### 2.2. Bakterijų išskyrimas iš dirvožemio

**Metodo esmė:** tam, kad būtų išgautos grynosios bakterijų kultūros, reikia jas išskirti iš jų natūralios aplinkos. Bakterijos buvo išskiriamos skiedimo metodu. Tai metodas, kurio metu yra atliekami serijiniai skiedimai. Atlikus numatytą skiedimų skaičių, mėginiai pasėjami giluminiu būdu į mitybos terpę ir inkubuojami optimalioje temperatūroje tamsoje. Po inkubavimo, užaugusios mikroorganizmų kolonijos yra apžiūrimos, pasirenkamos tinkamos pagal morfologinę išvaizdą ir vėliau gryninamos.

**Darbo eiga:** bakterijų išskyrimui paimta 10 dirvožemio mėginių iš Margininkų kaime (54.790<sup>o</sup>š. pl. 24.049<sup>o</sup>r. ilg.) esančių žemės ūkio paskirčiai naudojamų laukų.





2.2 pav. Dirvožemio mėginių paėmimo vietos, Margininkų kaimas, Kauno r.

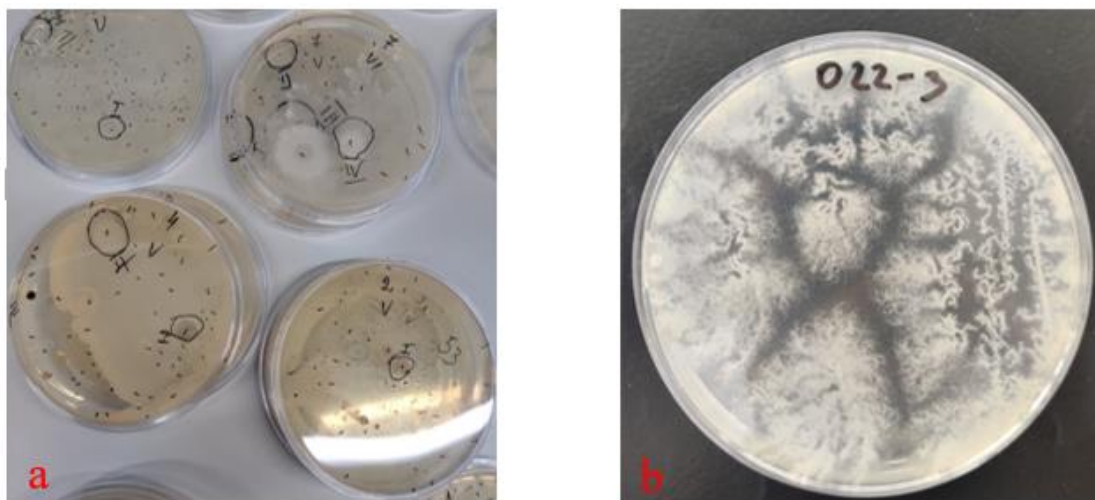
Dirvožemio mėginiai imti iš 5-10 cm gylio, sudėti į sterilius plastikinius maišus ir pristatyti į laboratoriją. Laboratorijoje visi mėginiai prasijoti pro 2,5 mm tankio sietus, kad žemė būtų homogenizuota. Sėjimams atlikti, po 10 g pasirinkto dirvožemio suspenduota 90 ml sterilaus skiediklio (0,9 g/L NaCl). Pradinė suspensija 10 minučių kaitinta 80 °C temperatūroje, kad būtų sunaikintos vegetatyvinės mikroorganizmų ląstelės, nes *Bacillus spp.* yra sporas sudarantys mikroorganizmai. Atlikti serijiniai dešimtkarčiai skiedimai iki  $10^{-6}$ . Gauti skiediniai po 1 ml sėti giluminiu būdu į PCA (angl. *Plate count agar*) agarą (Liofilhem, Italija). Prieš dedant lėkštes į termostatą (Termaks, Norvegija), jos buvo apverčiamos, kad būtų išvengta terpės atsiskiedimo dėl susidariusio kondensato ant lėkštelių dangtelių. Lėkštelės inkubuotos termostate (Termaks, Norvegija) 24-72 h 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos gautos kolonijos buvo atsirenkamos remiantis jų morfologinėmis savybėmis.

### 2.3. *Bacillus spp.* bakterijų išskyrimas ir gryninimas

**Metodo esmė:** pakartotinais persėjimais atliekant bakterijų gryninimą, išgryninti turimas bakterijų kultūras, kad Petri lėkštelėje augtų tik reikalinga gyna bakterijų kultūra, be pašalinių mikroorganizmų. Išgrynintos bakterijų kultūros padeda lengviau identifikuoti tiriamąjį objektą, nustatyti jam būdingą augimo terpę, bei temperatūrą. Gryninimo metu bakterijos yra atskiriamos nuo pašalinių ir nepageidaujamų mikroorganizmų kultūrų, kad viena kitai augimo metu neturėtų papildomos įtakos.

**Darbo eiga:** kolonijos, pasižyminčios *Bacillus* rūšims būdingomis morfologinėmis savybėmis - apvalios netaisyklingos formos, banguotais kraštais, rizoidinės, nepermatomos, kreminės spalvos kolonijos ir pan. - buvo persodintos kelis kartus ant PCA (angl. plate count agar) agaro kilpele, kad jas išgryninti ir vėliau būtų galima identifikuoti. Bakterijų gryninimui buvo atsirenkamos bakterijos, kurios atitiko *Bacillus* bakterijų morfologinius požymius – formą, kolonijų spalvą, dydį,

konsistenciją. Atrinkus bakterijas pagal atitinkamus rodiklius jos persėtos į naujas Petri lėkšteles su paruošta PCA terpe. Petri lėkštelės inkubuotos termostate, 37 °C temperatūroje. Bakterijų gryninimai buvo kartojami bent 3 kartus arba iki kol terpėje nebuvo matyti pašalinių mikroorganizmų.



2.3 pav. Bakterijų gryninimas. a – bakterijų kultūrų išskyrimas ir gryninimas, b – išskirta ir išgryninta bakterijų kultūra

#### 2.4. Bakterijų identifikavimas Gram'o dažymo metodu

**Metodo esmė:** metodas leidžia diferencijuoti bakterijas pagal jų ląstelių sienelių chemines ir fizines savybes bei nustatyti bakterijų fenotipą ir kultūros grynumą. Bakterijų sienelės yra sudarytos iš peptidoklikanų ir mureino. Gram-teigiamų bakterijų sienelės turi kur kas mažesni lipidų kiekį palyginus su gram-neigiamom bakterijomis. Gram-teigiamos bakterijos turi tinklinį sienelių paviršių, o gram-neigiamos, ploną fosfolipidinę membraną. Metilo mėlynojo dažai yra pakankamai smulkios sandaros, kad praeitų per abiejų ląstelių sienelės matricą, tačiau jodo dažam patekus yra kur kas sudėtingiau pasišalinti. Blankinimo tirpalas (etanolis 95%) patekęs ant ląstelių sienelių išsausina jas ir tuo pačiu pašalina jodo dažus. Taip pat ištirpina gram-neigiamų bakterijų išorinę membraną, kurios pagalba taip pat yra pašalinami jodo dažai susikaupę sienelės matricoje. Ląstelės sienelės storis apibūdina kaip efektyviai įsisavins tirpalą dažymo metu. Gramo dažymo principas remiasi ląstelių nudažymu tamsiai mėlynais dažais (genciano violetiniais), o tuomet naudojant blankinimo tirpalą yra pašalinami dažai tų ląstelių, kurių sienelės yra plonesnės, ir galiausiai naudojami raudoni dažai (safraninas). Ląstelės, kurių sienelės yra storesnės nusidažys mėlyna spalva (gram-teigiamos), nes jų sienelėse bus likęs tik genciano violetinis dažas, o ląstelių kurių sienelės yra plonesnės, bus raudonos (gram-neigiamos), kadangi blankinimo tirpalas pašalina pirminį genciano violetinių dažų tirpalą .

**Darbo eiga:** gram'o dažymo metodas pradedamas sterilizuojant objektinį stiklėlį su 95% etanoliu. Su sterilia inokuliacijos kilpele ant objekcinio stiklelio uždedamas lašas distiliuoto vandens, į kurį su sterilia kilpele paimamas nedidelis bakterijų kultūros mėginys ir įtrinamas 1 cm<sup>2</sup> plote kol išdžiūsta. Preparato fiksavimas atliekamas objekcinį stiklėlį pakaitinant virš liepsnos kelis kartus, po kelias sekundes. Ant paruošto preparato užpilama genciano violetinių dažų ir laikoma 1 min., tuomet pakartotinai užpilamas jodo tirpalas ir laikoma 1 min. 5 sek. plaunama distiliuotu vandeniu. Blankinama 95% etanoliu 45 sek., kol preparato melsvumas nublinksta. Ant objekcinio stiklelio užpilamas safranino tirpalas, laikoma 1 min., po kurio plaunama 5 sek. distiliuotu vandeniu. Objektinis stiklelis nudžiovinamas, uždedama imersinio aliejaus ir mikroskopuojama naudojant 100 kartų didinantį mikroskopinį objektyvą, įmerkiant jį į imersinį aliejų.

Taikant Gram'o dažymo metodą, *Bacillus spp.* bakterijos yra atrenkamos pagal joms būdingus morfologinius požymius. Šios rūšies bakterijos yra gram-teigiamos, dažniausiai pastebimos susijungusios poromis arba grandinėmis, su suapvalintais galiukais turinčiomis endosporas. Endosporos pasižymi ovalia ar cilindro forma ir yra itin atsparios nepalankioms aplinkos sąlygoms [98].

## 2.5. Iš dirvožemio išskirtų *Bacillus spp.* poveikio augalų augimo skatinimui tyrimai

**Metodo esmė:** tyrimas atliktas siekiant įsitikinti ar tyrimo metu iš dirvožemio išskirtos *Bacillus spp.* bakterijos turi įtakos augalo daigų, lapelių skaičiaus susidarymui, stiebo ir šaknų augimui. Pasirinktas augalas – kviečiai. Tyrimo pabaigoje buvo aprašomi fiziologiniai augalo pokyčiai.

**Darbo eiga:** tyrimui naudotos 24 val. šviežumo 37 °C temperatūroje termostate (Termaks, Norvegija) ant nuožulnaus PCA agaro užaugintos iš dirvožemio išskirtos bakterijos. Iš kiekvienos bakterijų kultūros pagaminta 10<sup>8</sup> KSV/ml (kolonijas sudarantys vienetai) bakterijų suspensija, kuria apveltos kviečių sėklos, kad 1 g sėklų būtų užkrėstas apie 10<sup>6</sup> KSV/g kiekvienos tiriamosios *Bacillus spp.* kultūros. Sėklų mėginiai 1 h laikyti kambario temperatūroje, kas 15 min. pamaišant, kad suspensija tolygiai padengtų visas sėklas. Į kiekvieną 12 cm skersmens vazoną įpilta po 300 g sterilaus smėlio ir susodinta po 5 vienos rūšies bakterijų suspensija bakterizuotas sėklas. Kiekvienas tyrimas atliktas dviem pakartojimais – t.y., kiekvienai suspensijai skirti du vazonai po 5 sėklas. Lygiagrečiai pasėti du vazonai su kviečių sėklomis, kurios 1 h buvo apdorotos steriliu distiliuotu vandeniu. Kviečių sėklos buvo auginamos 20 ± 2 °C temperatūroje, saulėtoje vietoje, 4 savaites, laistymui buvo naudojamas distiliuotas vanduo, kad vandenyje esančios medžiagos neturėtų papildomos įtakos augalo augimui. Po 4 savaičių, buvo atliekamas kviečių daigų vizualinis, bei fiziologinių pokyčių vertinimas. Vertinama buvo:

- Nustatytas išaugusių kviečių daigų skaičius;
- Sveikų lapų skaičius;
- Stiebo ilgis;
- Šaknų ilgis;
- Nudžiūvusių lapų skaičius;
- Išrauto augalo masė;
- Sausoji augalo masė.

## 2.6. Mikroskopinio grybo auginimas

**Metodo esmė:** tyrimuose naudojamų mikroskopinių grybų kultūros turi būti šviežios, kad būtų matoma periferinė augimo zona. Visi grybai buvo auginami ant PDA - bulvių agaro terpės (angl. potato dextrose agar) terpės (Liofilhem, Italija), 7 paras, tamsioje vietoje, 25 ± 2 °C temperatūroje. Buvo naudojamos 5 patogeninių grybų kultūros:

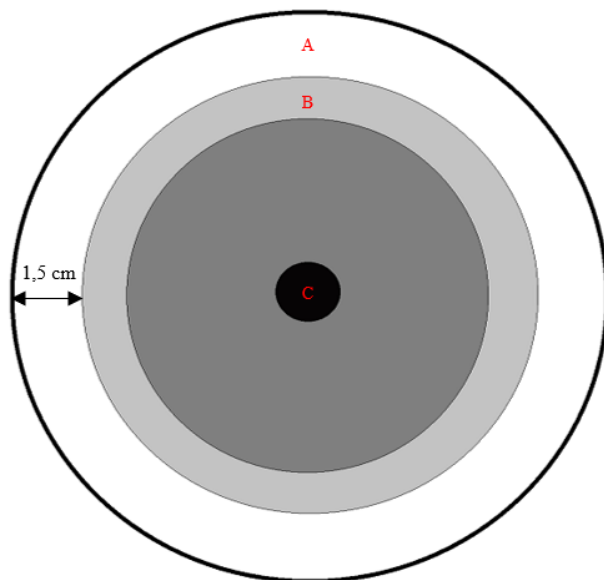
- *Aspergillus flavus*;
- *Fusarium graminearum* 4;
- *F. graminearum* 13121;
- *F. graminearum* 5883;
- *F. avenaceum*.

**Darbo eiga:** sporų išskyrimas iš grybienos fragmento yra pirmasis žingsnis sėjant mikroskopinius grybus. Grybienos fragmentas sumaišomas su 1 ml sterilaus vandens ir homogenizuojamas

purtyklėje, kol gaunama suspensija. Tada mėginys praskiedžiamas įpilant 0,1 ml suspensijos į 0,9 ml sterilaus vandens. Po to 10 sekundžių homogenizuojama. Terpės paviršius padengiamas 0,01 ml antrojo skiedimo suspensijos. Po 2 parų monosporinė kultūra perkeliama į Petri lėkštelę su PDA terpe. *A. flavus*, *F. graminearum* 4, *F. graminearum* 13121, *F. graminearum* 5883, *F. avenaceum* grybų kultūros inkubuotos termostate 7 paras  $25 \pm 2$  °C temperatūroje.

## 2.7. Antagonistinių savybių tyrimai dvigubos kultūros metodu

**Metodo esmė:** Dvigubos kultūros metodas gali būti naudojamas, norint iširti ar bakterijų kultūros turi antagonistinį poveikį patogeninių grybų augimui. Metodo atlikimo principas yra tas, kad vienoje Petri lėkštelėje yra sėjamas patogeninis grybas ir antagonistinė bakterijų kultūra (2.4 pav.). Tyrimo metu yra stebima bakterijų ir grybo mikromicetų augimo sąveika ir lyginama su kontrole – lėkštele, kurioje patogeninis grybas auga be antagonistinių bakterijų. Metodo esmė, kiekvieną dieną vertinti grybo augimo greitį lyginant su kontroline grupe. Antagonistinis aktyvumas vertintas lyginant grybo augimo skersmenį jam augant kontrolinėje Petri lėkštelėje (lėkštelėje be antagonistinės bakterijos), su tuo pačiu pelėsiniu grybu, kuris augo kartu su tiriamosiomis bakterijomis. Tyrimui buvo naudojamos etaloninės bakterijos *B. cereus* (B<sub>1</sub>), *B. circulans* (B<sub>2</sub>), *B. coagulans* (B<sub>3</sub>), *B. megaterium* (B<sub>4</sub>), *B. subtilis* (B<sub>5</sub>), *B. sphaericus* (B<sub>6</sub>) ir iš dirvožemio išskirtos bakterijos 022-3 (B<sub>7</sub>), 022-4 (B<sub>8</sub>), 2-1 (B<sub>9</sub>), 4-2 (B<sub>10</sub>), 8-1 (B<sub>11</sub>), 8-2 (B<sub>12</sub>). Grybo slopinimas identifikuojamas tada, kai kontrolinėje lėkštelėje grybo skersmuo pasiekia lėkštelės kraštą ir yra didesnis nei lėkštelėse, kuriose auga su bakterija, taip pat stebimi grybo micelio spalvos, formos, konsistencijos ir kiti pakitimai, rodantys šalia augančios bakterijos įtaką. Matavimai atliekami kiekvieną dieną, 7 paras arba iki kol kontrolinėse lėkštelėse augantis grybas pasiekia Petri lėkštelės kraštus.

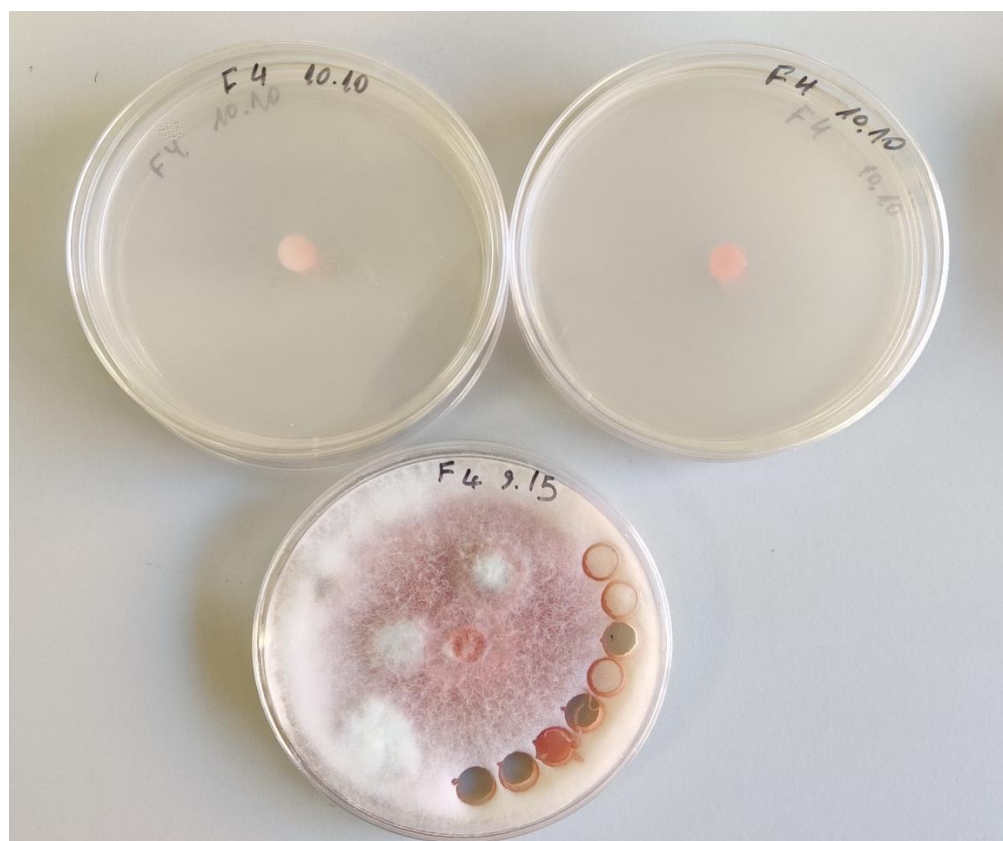


A – 1,5 cm atstumas nuo lėkštelės krašto iki antagonistinės bakterijos

B – Antagonistinė bakterija

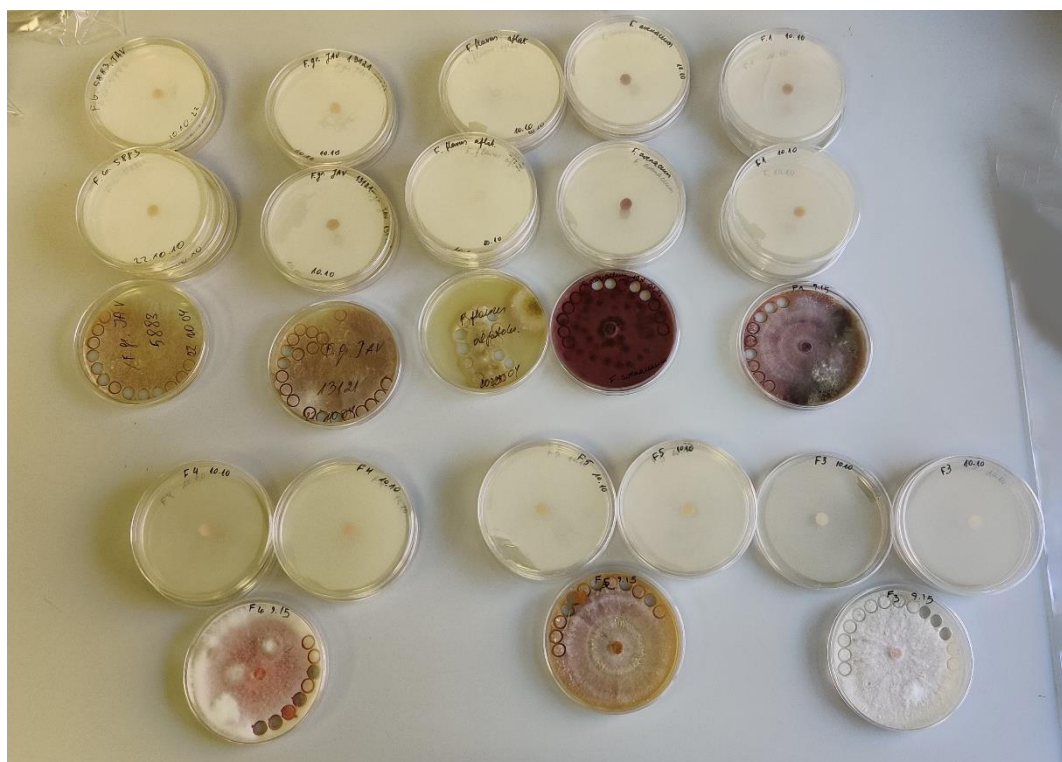
C – Patogeninis grybas

2.4 pav. Dvigubos kultūros sėjimo metodas



2.5 pav. Dvigubos kultūros sėjimo metodas, sėjant *Fusarium avenaceum* 4





2.6 pav. Dvigubos kultūros sėjimo metodu užsėtus lėkštelės

**Darbo eiga:** kiekviena tirta bakterijų kultūra persėjama į mėgintuvėlius ant nuožulnaus PCA agaro (Liofilhem, Italija), inkubuojama 24 h,  $37 \pm 2$  °C temperatūroje. Iš kiekvienos tiriamos bakterijų kultūros, vadovaujantis McFarland 0,5 standartu, pasiruošiama šviežia bakterijų suspensija, kurioje bakterijų kiekis yra vienodas, t.y.  $10^6$  KSV/ml.

Šiam tyrimui taip pat pasiruošiamos šviežios patogeninių grybų *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum* 4, *F. graminearum* 13121, *F. graminearum* 5883, *F. avenaceum* kultūros. Pelėsiniai grybai sėjami ant šviežiai sustingusios PDA terpės (Liofilhem, Italija), imant kiekvieno izoliato 5mm skersmens micelinį diską ir dedant miceliu žemyn į kiekvienos Petri lėkštelės centrą dviem pakartojimais. Norint įvertinti aplinkos temperatūros įtaką antagonizmui, lėkštelės inkubuotos termostate  $25 \pm 2$  °C ir  $37 \pm 2$  °C temperatūrose 7 paras. Antagonistinis bakterijų aktyvumas tirtas dvigubos kultūros metodu, jį pakoreguojant. Kiekvienos tiriamosios *Bacillus spp.* bakterijų suspensija inokuliuojama sterilia kilpele brėžiant apskritimą ant PDA terpės 1,5 cm atstumu nuo Petri lėkštelės krašto (vietoje atskirų brūkšnių, kaip aprašo autoriai) [99]. Kiekvienos lėkštelės centre padedamas 5 mm skersmens patogeninio grybo micelio diskas, kiekvieną variantą pakartojant po 2 kartus. Lėkštelės inkubuojamos termostate 25 ir  $37 \pm 2$  °C temperatūroje 7 paras. Po 2 parų kiekvieną dieną pradedamas matuoti grybo skersmuo.

### 2.7.1. Bakterijų antagonistinio poveikio vertinimas prieš patogeninius grybus naudojant slopinimo koeficientą

Antagonistinis aktyvumas buvo vertinamas pagal procentais išreikštą slopinimo koeficientą.

Vertinimas buvo atliekamas 7 paras arba iki kol kontrolėje auganti patogenas užauga per visą Petri lėkštelę (85 mm). Naudojant dvigubos kultūros metodą, matavimas buvo atliktas matuojant horizontaliai ir vertikalčiai patogeno micelio skersmenį ir apskaičiuojant aritmetinį vidurkį. Bakterijų daroma įtaka fitopatogenui buvo nustatoma apskaičiuojant procentinį slopinimo koeficientą formule:

$$x = \frac{(a-b)}{a} \cdot 100\%; \quad (1)$$

- a- kontrolėje augančio patogeninio grybo neveikiamo jokios bakterijos, skersmuo (mm);
- b- patogeninio grybo augančio kartu su bakterija, skersmuo (mm);
- x- procentinė slopinimo koeficiento išraiška (%)

Rezultatai pateikiami procentine išraiška skirstant kintamuosius į tris grupes:

- < 3 % mažas slopinimas;
- 3 – 20 % vidutinis slopinimas;
- 20 – 100 % stiprus slopinimas.

### 2.7.2. Bakterijų antagonistinio poveikio vertinimas prieš patogeninius grybus inkubuojant 25 °C ir 37 °C temperatūrose

Antagonistinis bakterijų aktyvumas buvo vertinamas kiekvieną parą, pagal užaugusių patogeninių grybų skersmens vidurkį. Slopinimo intensyvumas lyginamas su kontroline grupe. Temperatūros daroma įtaka patogeniui arba bakterinis slopinimas identifikuojamas tada, kai patogeninio grybo skersmens vidurkis, augantis kartu su bakterijų kultūra yra mažesnis nei kontrolinėje grupėje. Tyrimas vykdomas 7 paras arba iki kol kontrolinė grupė pasiekia 85 mm skersmenį.

## 2.8. Biocheminiai išskirtų bakterijų kultūrų identifikacijos metodai

### 2.8.1. Ureazės metodas

**Metodo esmė:** nustatyti, ar ištirtos iš dirvožemio bakterijos išskiria ureazę ir gali hidrolizuoti šlapalą, kad būtų išskirtas amoniakas ir anglies dioksidas. Bakterijų gentys ir rūšys gali būti identifikuojamos ureazės testo biocheminiu tyrimu, kurio rezultatai nurodo ar ši bakterija išskiria tiriamą fermentą. Ureazės testo agarą sudaro 2 % konc. šlapalas ir fenolio raudonasis – raudona spalva naudojama kaip pH indikatorius. Išskiriant didesnę kiekį amoniako, agaro pH ir spalva pakinta nuo gelsvos (6,8 pH) iki rausvos (8,2 pH) [100].

**Darbo eiga:** reikiamas agaro kiekis buvo sumaišytas su distiliuotu vandeniu. Tirpalas tuomet autoklavuojamas prie 121 °C, 15 psi, 15 min. Agarą atvėsina iki 55 °C. ir išpilstomas į Petri lėkštes, laukiama kol sustings. Ant sustingusio agaro kilpele užsėjama šviežios, 18-24 valandų bakterijų kultūros. Petri lėkštelės su užsėtomis bakterijų kultūromis buvo inkubuojamos termostate prie 37 ± 2 °C temperatūros, 24 – 48 valandas. Praėjus inkubavimo laikotarpiui stebimi spalvų pokyčiai.

## 2.8.2. Katalazės metodas

**Metodo esmė:** nustatyti, kurios *Bacillus spp.* padermės išskiria katalazės fermentą ir apsaugo bakterijas nuo oksidacinio poveikio. Katalazės fermentas neutralizuoja baktericidinį vandenilio peroksido poveikį, veikdamas patogeniškumą. Katalazės nustatymo tyrimui buvo galimi trys skirtingi metodai, tačiau pasirinktas „Slide drop“ metodas, dėl informatyvesnio rezultato. Šio testo rezultatas yra laikomas neigiamu, kai reakcijos metu nesusidaro burbulai, nes nėra katalazės fermentų. Putojimą lemia katalazės fermentai, kurie vykdo vandenilio peroksido hidrolizę. Teigiamas reakcijos rezultatas yra identifikuojamas tada, kai yra aiškiai matomas susimaišusių medžiagų putojimas [101].

**Darbo eiga:** katalazės metodui nustatyti buvo naudotas 3% konc. vandenilio peroksido ( $H_2O_2$ ) tirpalas ir trys skirtingos bakterijų kultūros – bakterijos išskirtos iš dirvožemio ir dvi kontrolinės kultūros, iš kurių, yra žinoma, kad viena turi katalazės fermentus, kita – ne.

Į Petri lėkštelę buvo įdėtas mikroskopinis stiklelis ir pasiruoštas Petri lėkštelės dangtelis, kuris buvo naudojamas kaip apsauga nuo katalazės reakcijos su bakterijomis išskiriamų aerozolių, kuriuose gali būti bakterijų likučių. Naudojant sterilią kilpelę buvo paimamas nedidelis kiekis bakterijų iš Petri lėkštelės, kurioje jos buvo inkubuojamos 18 – 24 valandas. Atsargiai, nepažeidžiant agarų paviršiaus, sterilia kilpele, buvo paimama bakterijų kultūra, kuri vėliau perkelta ant mikroskopinio stiklelio. Atsargumo kriterijus itin svarbus jei yra naudojamas kraujo agaras. Atsitiktinai patekusi kraujo raudonoji ląstelė automatiškai suklaidina testą, identifikuojant jį kaip teigiamą. Naudojant Pastero arba 1 ml pipetę, ant mikroskopinio stiklelio esančių bakterijų, užlašinamas vienas  $H_2O_2$  lašas. Bakterijų kultūros ir  $H_2O_2$  neturi būti sumaišomi tarpusavyje. Užlašinus  $H_2O_2$  ant bakterijų kultūros, Petri lėkštelė yra iš karto uždengiama dangteliu, siekiant sumažinti dujų išsiskyrimą į aplinką. Tuomet atliekama vizuali oro burbulų susidarymo patikra, kurios metu stebima reakcija -  $O_2$  ir  $H_2O$  išsiskyrimas. Po Petri lėkštele buvo naudojamas tamsios medžiagos fonas, kad būtų lengviau stebėti ir identifikuoti susidariusius burbuliukus.

Jei putojimas yra sunkiai pastebimas, arba reakcija vyksta neefektyviai, Petri lėkštelė gali būti uždengiama švriu mikroskopiniu stikleliu ir reakcija stebima pro mikroskopą, naudojant 40 kartų didinantį objektyvą.

## 2.8.3. Krakmolo hidrolizacijos tyrimas

**Metodo esmė:** krakmolo hidrolizacijos tyrimas atliekamas norint sužinoti ar mikroorganizmas suskaido krakmolą į mažesnės molekulinės masės junginius, tokius kaip maltozę ar gliukozę naudojant alfa amilazės fermentus.

Bakterijų maisto medžiagos, tokios kaip dekstrinas, maltozė ar gliukozė yra įsisavinamos iš dirvožemio, tačiau šių medžiagų pasisavinimas įmanomas tada kai yra hidrolizuojamas krakmolą. Krakmolo molekulės yra per didelės, kad patektų tiesiogiai į bakterijų ląsteles, todėl dirvožemyje esančios bakterijos išskiria egzofermentus (alfa-amilazę ir oligo – 1,6 – gliukozidazę). Fermentai suskaido krakmolo molekulę iki mažesnės molekulinės masės junginių, kuriuos bakterijos naudoja metabolizmui. Efektyvus *Bacillus spp.* metabolizmas, būtinas, norint, kad bakterija galėtų greičiau ir efektyviau vystytis augant kartu su patogenais vienoje aplinkoje. Hidrolizuojant krakmolą, bakterijos dirvožemyje prisideda prie organinių medžiagų skilimo, vykstant šiam procesui padidėja maistinių medžiagų kiekis dirvožemyje, kurio dėka yra skatinamas augalų augimas ir didinamas dirvožemio derlingumas [102].



Medžiagos naudojamos tyrimui:

- Jautienos sultinio ekstraktas (angl. Beef extract (Liofilchem, Italija));
- Agaras (Liofilchem, Italija);
- Krakmolas;
- Distiliuotas vanduo;
- Gram'o jodo tirpalas 10%;

Agaro pasiruošimas (svoris nurodomas 500 ml agaro):

- Jautienos sultinio ekstraktas – 1,5 g;
- Tirpus krakmolas – 5 g;
- Agaras – 6 g;
- Distiliuotas vanduo – 500 ml.

Distiliuotas vanduo supilamas į indą. Inde su distiliuotu vandeniu yra suberiamos atsvertos medžiagos ir gerai išmaišomos. Tirpalas vėliau autoklavuojamas prie 121 °C, 15 min., 15 psi. Agaro pH kambario temperatūroje turėtų būti  $7,5 \pm 0,2$ . Po autoklavavimo agaras išmaišomas, kad krakmolas vėl nesuliptų kartu ir atvėsinus iki 40 °C išpilstomas į Petri lėkšteles ir leidžiama sustingti.

**Darbo eiga:** Tyrimui buvo naudojamos šviežios iš dirvožemio išskirtų bakterijų kultūros (16 – 18 valandų). Sterilia kilpele paimama bakterijų kultūra, kuri nesiliečia su kitomis kultūromis ir pasėjama ant agaro paviršiaus. Petri lėkštelės su bakterijomis inkubuojamos termostate prie  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , 24 – 48 val. (iki 5 dienų) [103]. Po inkubavimo į Petri lėkšteles buvo įpilama Gramo jodo tirpalo, kad būtų užlietas visas agaro paviršius. Rezultatai stebimi iškart. Tamsiai mėlynas fonas pasirodo iškart užpylus jodo tirpalo, aureoles, esančios aplink bakterijų kultūras, rodo teigiamą testą (krakmolo hidrolizacija įvyko). Neatsiradus aureolėms, teigiama, kad krakmolas nebuvo hidrolizuotas – testas neigiamas.

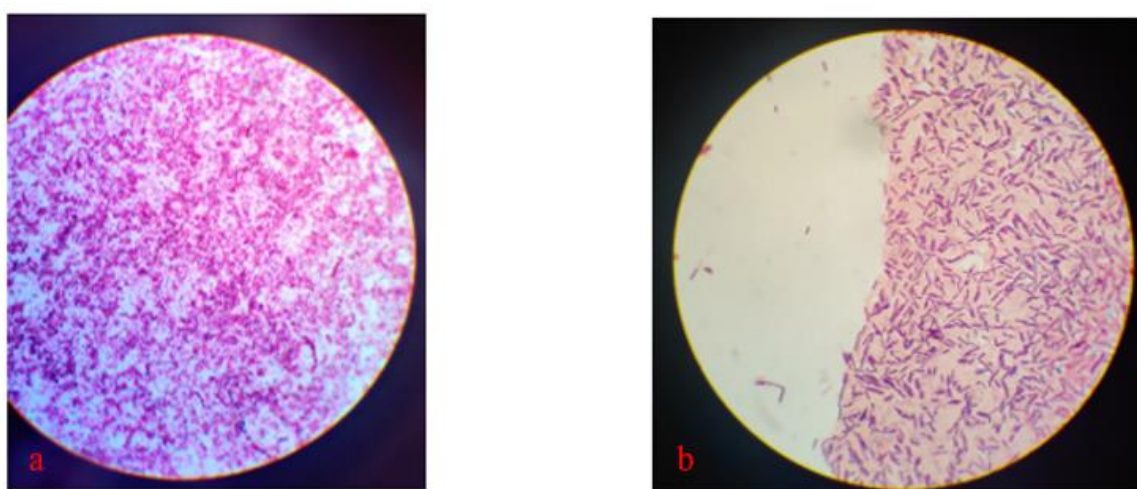
### 3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

#### 3.1. Bakterijų identifikavimas Gram'o dažymo metodu

Atlikus Gram'o dažymo metodą, buvo nustatyta, kad iš dirvožemio išskirtos bakterijos yra:

- Lazdelės formos;
- Sporas sudarančios;
- Gram-teigiamos.

Šie nustatyti kriterijai apibūdina *Bacillus spp.* bakterijų rūšį. Šiems kriterijams taip pat atitinka ir *Clostridium* bakterijų grupė, tačiau jos yra anaerobai. Dėl vėliau atliktų tyrimų, buvo nustatyta, kad *Bacillus spp.* bakterijos yra aerobai, dėl to galima teigti, kad iš dirvožemio išskirtos bakterijos yra *Bacillus spp.* bakterijos.



3.1 pav. Bakterijų identifikavimas Gram'o dažymo metodu. a – 022-3 ir b – 022-4 bakterijų mėginių mikroskopinis vaizdas per 100 kartų padidinimo objektyvą

#### 3.2. Bakterijų biocheminiai identifikavimo metodai

3.1 lentelė. Bakterijų biocheminiai identifikavimo metodai („-“ – neigiamas; „+“ – teigiamas)

Bakterija	Testo pavadinimas		
	Ureazės testas	Katalazės testas	Krakmolo hidrolizacija
022-03	-	+	-
022-04	-	+	+
2-1	-	+	-
4-2	-	+	+
8-1	-	+	-
8-2	-	+	+

Šie identifikavimo metodai buvo atlikti, norint identifikuoti iš dirvožemio išskirtų bakterijų charakteristikas. Metodų atlikimo tikslas - sužinoti konkrečią informaciją apie bakterijų gebėjimą

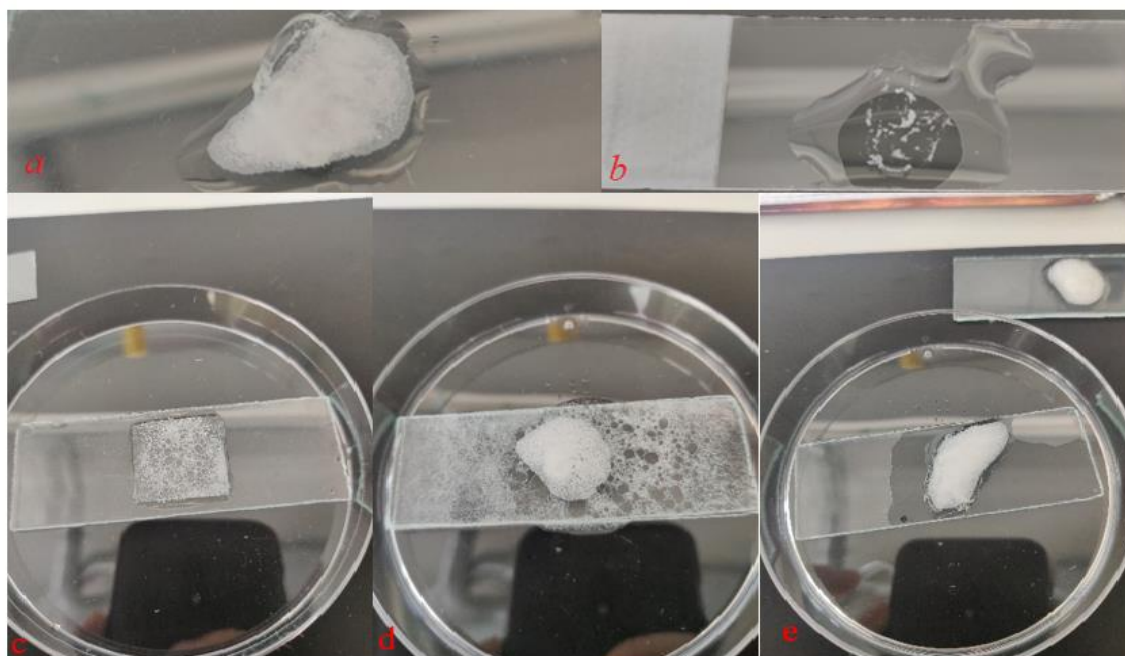
išskirti metabolitines medžiagas. Remiantis gautais rezultatais, galima nustatyti ar šios bakterijos atitinka šių bakterijų rūšiai būdingoms savybėmis ar jie priklauso kitai bakterijų kultūrai, nei numatyta. Pvz., dauguma *Bacillus spp.* bakterijų kultūrų nepasižymi gebėjimu skaidyti urėjos [104]. Katalazės fermentų išskyrimas yra būdingas didžiajai daliai *Bacillus spp.* bakterijų kultūrų [105]. Krakmolo hidrolizacija yra būdinga tarp šios genties bakterijų, tačiau ne visos geba hidrolizuoti krakmolą [106].

### 3.2.1. Ureazės testas

Atliktame ureazės teste, buvo vertinama, ar bakterijos geba skaidyti ureazę į amoniaką. Nei viena iš tirtų bakterijų neskaidė ureazės, visi testai buvo neigiami.

### 3.2.2. Katalazės metodas

Atliktame tyrime buvo vertinama, kaip tirtos bakterijos sąveikauja su vandenilio peroksidu ( $H_2O_2$ ) (3.2 pav.). Teigiamas testas buvo nustatytas visuose mėginiuose – visos bakterijos turėjo katalazės fermentų, kurie joms leido skaidyti  $H_2O_2$  iki  $H_2O$  ir  $O_2$ . Rezultatas matomas 3.2 paveiksle.



3.2 pav. Katalazės metodo rezultatai. a – teigiama kontrolė, *Staphylococcus aureus*, b - neigiama kontrolė, *Enterococcus faecalis*, c-e – iš dirvožemio išskirtos *Bacillus spp.*

### 3.2.3. Krakmolo hidrolizacijos tyrimas

Krakmolo hidrolizacija yra procesas, kuris leidžia bakterijoms lengviau įsisavinti medžiagas. Krakmolo molekulės yra per didelės, kad patektų per bakterijų sieneles, todėl išskirdamos  $\alpha$  – amilazės ir oligo-1,6-gliukozidazės fermentus, jos krakmolą suskaido iki mažesnės molekulinės masės junginių, tokių kaip dekstrinas, maltozė ar gliukozė, kurie gali būti naudojami metabolizmui [107].



**3.3 pav.** Krakmolo hidrolizacijos rezultatai. a – teigiamas krakmolo hidrolizacijos testas, b – neigiamas krakmolo hidrolizacijos testas, c – kontrolė. Kontrolėi buvo naudojamos *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis*

Atlikus krakmolo hidrolizacijos testą, buvo nustatyta, kad pusę tirtų bakterijų hidrolizavo krakmolą. Bakterijų kultūros (3.3 pav. „a’’), išskyrusios  $\alpha$  – amilazės ir oligo-1,6-gliukozidazės fermentus galėjo skaidyti krakmolą. O kitos tirtos bakterijos (3.3 pav. „b’’) šių fermentų neišskyrė, ir krakmolas nebuvo hidrolizuotas. Atliktoje kontrolinėje grupėje (3.3 pav. „c’’) *E. coli* bakterija nehidrolizavo krakmolo, o *B. subtilis* bakterija – hidrolizavo.

### 3.3. *Bacillus spp.* poveikis augalų augimo skatinimui

Tyrimas atliktas, kurio tikslas nustatyti, ar iš dirvožemio išskirtos bakterijos skatina augalų augimą (3.2 lentelė). Kviečiai vazonėliuose su steriliu smėliu buvo auginami iki skalės numerio - 21 pagal BBCH (vok. *Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical industry*) augalo vystymosi skalę. Kontrolinių (K) ir stimuliuotų bakterijomis kviečių duomenys pateikti 3.2 lentelėje. Daugiausiai išdygusių kviečių ūglių buvo nustatyta mėginyje Nr. 5 – 9 vnt., mažiausiai 1 ir 4 mėginiuose – 6 vnt. Likusiuose mėginiuose ūglių skaičius buvo po 8 vnt.

**3.2 lentelė.** Bakterijų įtaka kviečių augimui

Eil. Nr.	Mėginys (augimo skatin-tojas)	Daigų skaičius (vnt.)	Lapelių skaičius (vnt.)	Stiebo(-ų) ilgis (cm)	Šaknų ilgis (cm)	Nudžiūvusių lapelių skaičius (vnt.)	Svoris išrautų (g)	Svoris išdžiovintų (g)
1.	022-3	2+4	25	33	39,5	4	3,244	0,896
2.	022-4	4+4	32	31	44,5	8	3,343	1,036
3.	2-1	4+4	32	33	44	5	2,498	0,663
4.	4-1	3+3	25	34,5	33	4	2,478	0,651
5.	8-1	4+5	40	33	54,5	6	3,658	1,182
6.	8-2	3+5	30	30	35,5	7	2,436	0,787
7.	K	5+3	32	37	69	0	4,06	0,901

Didžiausią užaugusių lapelių skaičių turėjo mėginys Nr. 5 – 40 vnt. lapelių, mažiausiai buvo mėginiuose Nr. 1 ir 4 – 25 vnt.

Matuojant užaugusių kviečių stiebo ir šaknų ilgį, galima teigti, kad sėklų apdorojimas bakterijų suspensijomis neturėjo didelės įtakos stiebų ir šaknų ilgiams. Kontrolinės grupės (augalų, kurių sėklos nebuvo apdorotos bakterijų suspensijomis) augalų stiebų ir šaknų ilgiai buvo didžiausi. Kontrolinių augalų stiebo ilgis – 37 cm, šaknų – 69 cm, trumpiausias stiebas buvo mėginio Nr. 6 ir siekė 30 cm, o trumpiausias šaknų ilgis – 4-to mėginio ir siekė 33 cm.

Lyginant nudžiūvusių lapelių skaičių, tai kontroliniuose mėginiuose jų nebuvo visai, tačiau daugiausiai nudžiūvusių lapelių buvo mėginyje Nr. 2 – 8 lapeliai ir 6 mėginyje – 7 lapeliai.

Matuojant išrautų augalų svorį, didžiausias augalų svoris buvo užfiksuotas kontrolinėje grupėje – 4,06 g. Mažiausiai svėrė 6 mėginio augalai – 2,436 g. Dideliam kontrolinio augalo svoriui įtakos galėjo turėti tai, kad jų šaknų sistema buvo labai ilga ir susipynusi tarpusavyje (jų šaknys buvo ilgiausios – 69 cm), dėl ko smėlio išvalymui buvo naudojamas vanduo, kad išplauti jį. Kadangi kontroliniame mėginyje buvo didžiausias šaknų kiekis, jame galėjo net ir po šaknų nusausinimo užsilikti tiek nepageidaujamo vandens ar smėlio likučių. Tokią prielaidą galima daryti remiantis išdžiovintų augalų svoriu. Kadangi kontrolinio sėjimo išdžiovintų augalų svoris jau nebuvo didžiausias, jis siekė 0,901 g., tuo tarpu didžiausias išdžiovintų augalų svoris buvo mėginių Nr. 2 – 1,036 g. ir Nr. 5 – 1,182 g.

Palyginus gautus duomenis matyti, kad didžiausias stimuliuojantis efektas gautas naudojant bakterijų 8-1 suspensiją, kadangi šis mėginys turėjo daugiausiai išdygusių augalų ūglių, didžiausių lapelių skaičių, augalo šaknų ilgis buvo vidutiniškai 27,9 proc. didesnis nei kitų bakterijų suspensijomis paveiktų augalų.

Atlikus šį tyrimą, galima teigti, kad vasarinių kviečių sėklų apdorojimas bakterijų suspensijomis, turėjo įtakos augalo išdygimui, susidariusių lapelių skaičiui bei pačio augalo svoriui. Tačiau taip pat bakterijų suspensijos gali ir slopinti augalo stiebo, šaknų augimą, bei padidinti nudžiūvusių lapelių skaičių.

N. H. Jinal ir N. Amaresan, 2020 metais atliko tyrimą, kuriame taip pat nustatinėjo ar *Bacillus spp.* bakterijų gentys turi įtakos augalo augimui. Gauti rezultatai sutapo su mūsų tyrime gautais rezultatais. Tiek mūsų, tiek nurodytame literatūroje tyrime, tirtų augalų galutinė masė po auginimo kartu su *Bacillus spp.* bakterijomis buvo didesnė nei kontrolinėje grupėje [108].

### **3.4. *Bacillus spp.* antagonistinių savybių nustatymas naudojant etalonines ir iš dirvožemio išskirtas bakterijas**

Visi tyrimai buvo atliekami naudojant etalonines bakterijas ir iš dirvožemio išskirtas bakterijas. Pateikiami duomenys atitinka procentinę išraišką reiškiančią sumažėjusio patogeninio grybo skersmenį veikiant atitinkamų bakterijų kultūrų. Rezultatai (3.3 lentelė) lyginami su kontroline grupe, kurios skersmens vidurkis antrą parą buvo 38,5 mm, trečią – 51,5 mm, ketvirtą – 67,5 mm ir penktą – 85 mm. Didžiausias slopinimo koeficientas buvo užfiksuotas B<sub>7</sub> bakterijų kultūros, ketvirtą parą. *F. graminearum* 4 patogeninis grybas, augantis Petri lėkštelėje kartu su 022-3 bakterija, užaugo 44,4 proc. mažesnis nei kontrolinėje grupėje. Mėginiuose B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub> ir B<sub>12</sub> yra matoma patogeno slopinimo tendencija. Nuo matavimo pradžios t.y. antros paros iki pabaigos – penktos paros, bakterijų slopinimo koeficientas dinamiškoje didėjo. Tai reiškia, kad atitinkamai kiek patogeninis grybas kontrolėje didėjo, jį tiek pat arba stipriau slopino bakterijos augančios toje pačioje terpėje. Remiantis slopinimo koeficiento skale, antrąją parą dviejuose mėginiuose – B<sub>7</sub> ir B<sub>9</sub> buvo pastebimas stiprus slopinimo koeficientas grybo atvžilgiu > 20 proc. Penkiuose mėginiuose – B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, buvo vidutinis

slopinimo koeficientas: 3 – 20 proc. Dviejuose mėginiuose – B<sub>4</sub> ir B<sub>10</sub> patogeninis grybas buvo slopinamas silpnai < 3 proc. Likę trys mėginiai – B<sub>5</sub>, B<sub>9</sub> ir B<sub>11</sub>, juose buvo fiksuojama neigiama slopinimo reikšmė (augimo skatinimas), reiškia, kad grybas augantis kartu su bakterija buvo didesnis nei kontrolinėje grupėje.

**3.3 lentelė.** Etaloninių ir iš dirvožemio išskirtų bakterijų slopinimo koeficientas (proc.) prieš *Fusarium graminearum* 4 grybą

Bakterijų kultūros	Slopinimo koeficientas tyrimo eigoje, proc.			
	2 para	3 para	4 para	5 para
Kontrolė (mm)	38,5	51,5	67,5	85
B <sub>1</sub>	10,4	15,5	25,9	30,1
B <sub>2</sub>	6,5	0,9	-1,5	3,7
B <sub>3</sub>	14,3	20,4	28,2	33,7
B <sub>4</sub>	2,6	5,5	12,6	13,5
B <sub>5</sub>	-7,9	2,9	20	42,3
B <sub>6</sub>	6,5	2,9	11,1	33,1
B <sub>7</sub>	28,6	30,1	44,4	39,9
B <sub>8</sub>	11,7	2,9	22,9	28,2
B <sub>9</sub>	32,5	21,4	-18,5	0,6
B <sub>10</sub>	0	0,9	10,4	-0,6
B <sub>11</sub>	-11,7	2,9	-2,2	-4,3
B <sub>12</sub>	19,5	30,1	36,3	39,9

Mėginiai su bakterijų kultūromis: B<sub>1</sub> – *B. cereus*; B<sub>2</sub> – *B. circulans*; B<sub>3</sub> – *B. coagulans*; B<sub>4</sub> – *B. megaterium*; B<sub>5</sub> – *B. subtilis*; B<sub>6</sub> – *B. sphaericus*; B<sub>7</sub> – 022-3; B<sub>8</sub> – 022-4; B<sub>9</sub> – 2-1; B<sub>10</sub> – 4-2; B<sub>11</sub> – 8-1; B<sub>12</sub> – 8-2

Rezultatai (3.4 lentelė) lyginami su kontroline grupe, kurios skersmens vidurkis antrą parą buvo 55 mm, trečią – 73 mm, ketvirtą – 85 mm.

**3.4 lentelė.** Etaloninių ir iš dirvožemio išskirtų bakterijų slopinimo koeficientas (proc.) prieš *Fusarium avenaceum* grybą

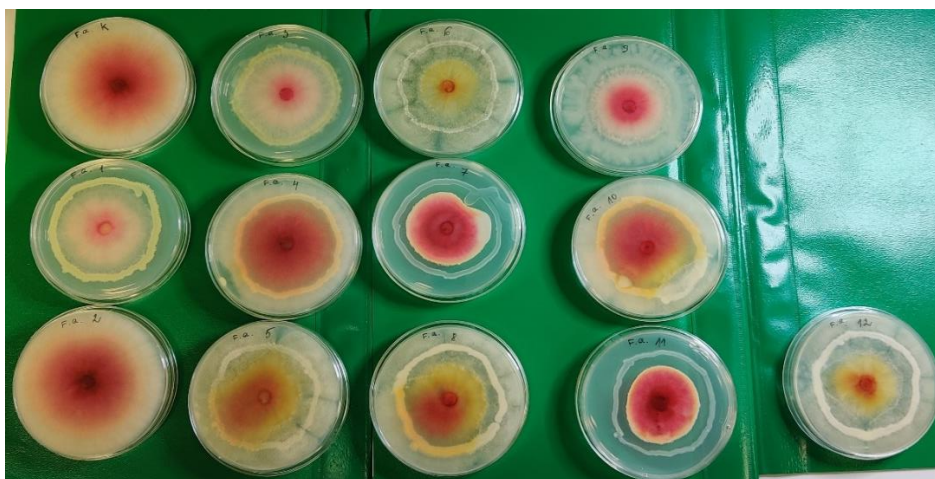
Bakterijų kultūros	Slopinimo koeficientas tyrimo eigoje, proc.		
	2 para	3 para	4 para
Kontrolė (mm)	55	73	85
B <sub>1</sub>	18,2	29,5	34,7
B <sub>2</sub>	15,8	2,7	0
B <sub>3</sub>	16,1	24,7	20,6
B <sub>4</sub>	10,9	15,1	4,1
B <sub>5</sub>	6,7	10,9	4,2
B <sub>6</sub>	2,4	3,2	0
B <sub>7</sub>	25,5	36,3	44,1
B <sub>8</sub>	7,2	7,5	0
B <sub>9</sub>	4,8	3,4	4,1
B <sub>10</sub>	12,7	20,3	0
B <sub>11</sub>	30	33,6	48,2
B <sub>12</sub>	6,3	0	0

Mėginiai su bakterijų kultūromis: B<sub>1</sub> – *B. cereus*; B<sub>2</sub> – *B. circulans*; B<sub>3</sub> – *B. coagulans*; B<sub>4</sub> – *B. megaterium*; B<sub>5</sub> – *B. subtilis*; B<sub>6</sub> – *B. sphaericus*; B<sub>7</sub> – 022-3; B<sub>8</sub> – 022-4; B<sub>9</sub> – 2-1; B<sub>10</sub> – 4-2; B<sub>11</sub> – 8-1; B<sub>12</sub> – 8-2

Didžiausi slopinimo koeficientai po trijų parų buvo fiksuojami B<sub>1</sub>, B<sub>7</sub>, B<sub>10</sub> ir B<sub>11</sub> mėginiuose – 29,5 proc., 36,3 proc., 20,3 proc., ir 33,6 proc. atitinkamai. Didžiausi slopinimo koeficientai po keturių parų buvo mėginiuose B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>7</sub> ir B<sub>11</sub> kuriuose grybo augimą veikė *B. cereus*, *B. coagulans*, 022-3 ir 8-1 bakterijų kultūros, jų slopinimo koeficientas buvo 34,7 proc., 20,6 proc., 44,1 proc., 48,2 proc. atitinkamai. Silpnėsnis slopinimas matomas B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>9</sub> mėginiuose. Mėginiuose B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>8</sub>, B<sub>10</sub> ir B<sub>12</sub> augančio fitopatogeninio grybo micelinis augimas nebuvo slopinamas. Mėginiuose B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>8</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub>, galima matyti patogeninio grybo micelio spalvos ir augimo formos pakitimus. Grybo micelis palyginti su kontrolėje augančiu, šiuose mėginiuose augo šviesesnės spalvos, retesnis ir ne taip tolygiai, tai reiškia, kad bakterijų kultūros turėjo neigiamą įtaką grybo micelio augimui.

Lyginant visų tirtų bakterijų kultūrų antagonistinį poveikį, per visą matavimo laikotarpį, labiausiai *F. avenaceum* patogeno augimą slopino iš dirvožemio išskirtos bakterijų kultūros 022-3 ir 8-1. Trys bakterijų kultūros esančios B<sub>1</sub>, B<sub>7</sub>, B<sub>11</sub> mėginiuose, stipriai slopinimo *F. avenaceum* grybo augimą, nes viso inkubavimo laikotarpio slopinimo koeficientų vidurkis buvo didesnis nei 20 proc. Mėginiuose B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>9</sub> ir B<sub>10</sub> fitopatogeninis grybas buvo slopinamas vidutiniškai, o likusiuose – B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>8</sub>, B<sub>12</sub> silpnai.





**3.4 pav.** *Fusarium avenaceum* grybo augimo slopinimo tyrimas, naudojant etalonines ir iš dirvožemio išskirtas bakterijas. Mėginiai su bakterijų kultūromis: B<sub>1</sub> – *B. cereus*; B<sub>2</sub> – *B. circulans*; B<sub>3</sub> – *B. coagulans*; B<sub>4</sub> – *B. megaterium*; B<sub>5</sub> – *B. subtilis*; B<sub>6</sub> – *B. sphaericus*; B<sub>7</sub> – 022-3; B<sub>8</sub> – 022-4; B<sub>9</sub> – 2-1; B<sub>10</sub> – 4-2; B<sub>11</sub> – 8-1; B<sub>12</sub> – 8-2

3.4 paveiksle pateikiama keturių parų *Fusarium avenaceum* augimo rezultatai dvylikos skirtingų bakterijų poveikyje.

Rezultatai (3.5 lentelė) lyginami su kontroline grupe, kurios skersmens vidurkis antrą parą buvo 67 mm, trečią – 85 mm.

**3.5 lentelė.** Etaloninių ir iš dirvožemio išskirtų bakterijų slopinimo koeficientas (proc.) prieš *Fusarium graminearum* 13121 grybą

Bakterijų kultūros	Slopinimo koeficientas tyrimo eigoje, proc.	
	2 para	3 para
Kontrolė (mm)	67	85
B <sub>1</sub>	0	38,2
B <sub>2</sub>	18,7	2,9
B <sub>3</sub>	26,9	41,2
B <sub>4</sub>	28,4	15,3
B <sub>5</sub>	17,9	14,1
B <sub>6</sub>	22,3	19,4
B <sub>7</sub>	41,8	55,8
B <sub>8</sub>	18,6	20,5
B <sub>9</sub>	38	63,5
B <sub>10</sub>	17,9	32,3
B <sub>11</sub>	17,9	35,2
B <sub>12</sub>	43,2	62,9

Mėginiai su bakterijų kultūromis: B<sub>1</sub> – *B. cereus*; B<sub>2</sub> – *B. circulans*; B<sub>3</sub> – *B. coagulans*; B<sub>4</sub> – *B. megaterium*; B<sub>5</sub> – *B. subtilis*; B<sub>6</sub> – *B. sphaericus*; B<sub>7</sub> – 022-3; B<sub>8</sub> – 022-4; B<sub>9</sub> – 2-1; B<sub>10</sub> – 4-2; B<sub>11</sub> – 8-1; B<sub>12</sub> – 8-2



Atlikus tyrimą, nustatyta, kad didžiausias slopinimo koeficientas buvo trečią parą, B<sub>9</sub>, B<sub>7</sub> ir B<sub>12</sub> mėginiuose – 63,5 proc., 55,8 proc. ir 62,9 proc. atitinkamai. Patogeninis grybas augantis terpėje su 2-1 bakterija, po trijų parų, buvo 63,5 proc. mažesnis, nei augant kontrolinėse lėkštelėse. Po dviejų parų, vienintelė *B. cereus* bakterija neslopino patogeno, o *B. circulans* bakterija, po trijų parų, turėjo silpną slopinimą – 2,9 proc. Patogeninis grybas viso tyrimo metu buvo stipriai slopinamas daugumos bakterijų – slopinimo koeficientas buvo didesnis nei 20 proc. Mėginių B<sub>7</sub>, B<sub>9</sub> ir B<sub>12</sub> slopinimo koeficientai, tiek po dviejų ir trijų parų matavimų buvo didžiausi, lyginant su kitomis bakterijomis. Galima teigti, kad tiek etalonišės, tiek iš dirvožemio išskirtos bakterijos geba bent vidutiniškai slopinti patogeninį *F. graminearum 13121* grybą.

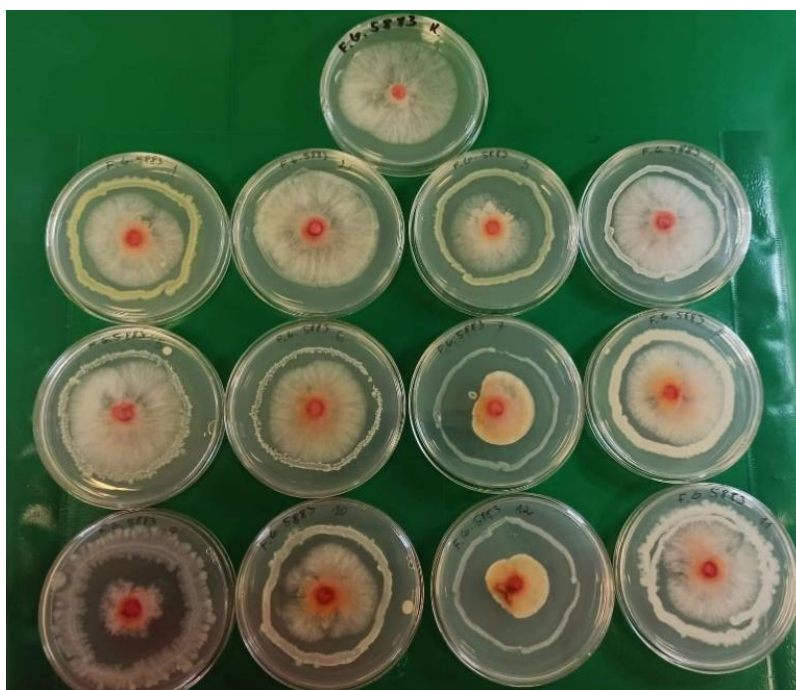
**3.6 lentelė.** Etalonių ir iš dirvožemio išskirtų bakterijų slopinimo koeficientas (proc.) prieš *Fusarium graminearum 5883* grybą

Bakterijų kultūros	Slopinimo koeficientas tyrimo eigoje, proc.	
	2 para	3 para
Kontrolė (mm)	64	85
B <sub>1</sub>	2,3	35,3
B <sub>2</sub>	14,1	11,8
B <sub>3</sub>	31,3	35,3
B <sub>4</sub>	16,4	26,5
B <sub>5</sub>	15,6	11,8
B <sub>6</sub>	20,3	17,7
B <sub>7</sub>	47,7	52,4
B <sub>8</sub>	14,1	35,3
B <sub>9</sub>	64,8	50,6
B <sub>10</sub>	25,8	29,4
B <sub>11</sub>	20,3	32,4
B <sub>12</sub>	51,6	52,4

Mėginiai su bakterijų kultūromis: B<sub>1</sub> – *B. cereus*; B<sub>2</sub> – *B. circulans*; B<sub>3</sub> – *B. coagulans*; B<sub>4</sub> – *B. megaterium*; B<sub>5</sub> – *B. subtilis*; B<sub>6</sub> – *B. sphaericus*; B<sub>7</sub> – 022-3; B<sub>8</sub> – 022-4; B<sub>9</sub> – 2-1; B<sub>10</sub> – 4-2; B<sub>11</sub> – 8-1; B<sub>12</sub> – 8-2.

12 skirtingų bakterijų buvo pasodintos į atskiras Petri lėkštutes kartu su patogenu ir vertinamas jo slopinimas lyginant su kontrole (antrą parą – 64 mm, trečią parą – 85 mm) (3.6 lentelė).

Labiausiai prislopintas patogenas buvo mėginyje B<sub>9</sub> – 64,8 proc. *F. graminearum 5883* buvo taip pat stipriai slopinamas ir kitų mėginių, tokių kaip - B<sub>3</sub>, B<sub>7</sub> ir B<sub>12</sub>, likusios bakterijos taip pat efektyviai slopino šio patogeno augimą. Po dviejų parų augimo silpniausiai šį patogeną slopino etalonišė bakterija *B. cereus*, kuri už kontrolinę grupę buvo mažesnė 2,3 proc. 3.6 paveiksle pateikiamas vaizdinis *Fusarium graminearum 5883* patogeninio grybo augimas su bakterijų slopinimu.



**3.5 pav.** *Fusarium graminearum* 5883 augimo slopinimas etaloninių ir iš dirvožemio išskirtų bakterijų poveikyje

Vertinant 3-čios paros rezultatus, didžiausias slopinimo koeficientas buvo fiksuojamas grybo augančio B<sub>7</sub> ir B<sub>12</sub> mėginiuose – 52,4 proc. Mažiausiai slopinamas patogeninis grybas buvo B<sub>2</sub> ir B<sub>5</sub> mėginiuose, kuriuose buvo 11,8 proc. mažesnis už kontrolėje augantį *F. graminearum* 5883.

Vertinant abiejų parų rezultatus, galime teigti, kad patogeninio grybo *F. graminearum* 5883 augimas buvo efektyviai slopinamas visų 12 skirtingų bakterijų.

K. Ntushelo ir kolegų, 2019 metais atliko tyrimą, kuriame nustatinėjo *Bacillus spp.* kultūrų atsparumas prieš patogeninius *Fusarium graminearum* grybus aprašė, kad šios bakterijos gali slopinti patogeninius grybus ir būti pritaikomos ekologiškame žemės ūkio naudojime. Mūsų atliktame tyrime rezultatai sutapo, su literatūroje aprašomais, todėl galima teigti, kad dalis *Bacillus spp.* bakterijų kultūrų gali būti naudojamos kaip alternatyva cheminiams pesticidams ir taip pat sėkmingai slopinti *Fusarium graminearum* genčių patogeninius grybus [109].

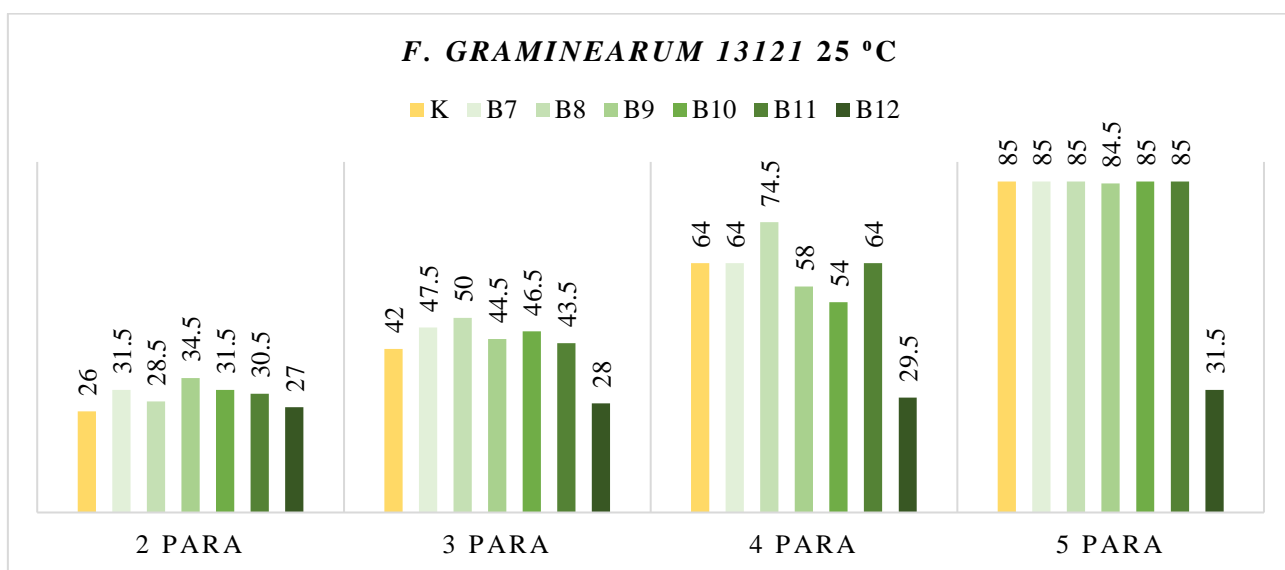
### **3.5. *Bacillus spp.* antagonistinių savybių nustatymas prieš fitopatogeninius grybus naudojant iš dirvožemio išskirtas bakterijas, inkubuojant skirtingose temperatūrose – 25 °C ir 37 °C**

Tiriant iš dirvožemio išskirtų *Bacillus spp.* bakterijų antagonistinį poveikį fitopatogeninių grybų augimui, tyrimai buvo atlikti naudojant dvi inkubavimo temperatūras – 25 °C - temperatūrą, palankią grybo augimui ir 37 °C - temperatūrą, palankią sporinių *Bacillus spp.* augimui.

#### **3.5.1. *Fusarium graminearum* 13121 slopinimas inkubuojant 25 °C ir 37 °C kartu su iš dirvožemio išskirtomis *Bacillus spp.* bakterijomis**

3.7 paveiksle pateikiami duomenys (mm), kaip iš dirvožemio išskirtos bakterijos slopino *F. graminearum* 13121 fitopatogeninį grybą, auginant 25 °C temperatūroje. Vertinant antros paros rezultatus, buvo nustatyta, kad nei viena iš bakterijų neslopino fitopatogeninio grybo. Visi mėginiai, kuriuose patogenas augo kartu su skirtingomis bakterijomis, užaugo daugiau nei kontrolėje augantis

mėginys. Tačiau remiantis trečios paros duomenimis, patogenas buvo labiausiai slopinamas B<sub>6</sub> mėginyje – 28 mm, kai kontrolė buvo užaugusi 42 mm., likusios bakterijos, patogeno neslopino, priešingai – su bakterijomis augantis patogeninis grybas buvo didesnis nei kontrolėse lėkštelėse. Tik ketvirtą parą buvo pastebimi ryškesni *F. graminearum* 13121 augimo slopinimai. Lyginant su kontroline grupe – 64 mm, patogenas buvo slopinamas trijų bakterijų mėginiuose: B<sub>9</sub>, B<sub>10</sub> ir B<sub>12</sub> – 58 mm, 54 mm, 29,5 mm, atitinkamai. Penktą parą tyrimas buvo sustabdytas, kadangi kontrolė buvo pasiekusi 85 mm. Visos bakterijos penktą parą neslopino patogeninio grybo, išskyrus B<sub>12</sub> mėginyje augančią bakteriją, kurios poveikyje patogenas užaugo tik iki 31,5 mm, kai likusiuose mėginiuose, grybo skersmuo siekė 85 mm. Lyginant mėginio B<sub>12</sub> slopinimą su kitų mėginių slopinimu viso tyrimo metu, galima matyti, kad slopinimas buvo pastovus ir stiprus. Per keturias paras, grybas augdamas kartu su šia bakterija paaugo tik 4,5 mm.



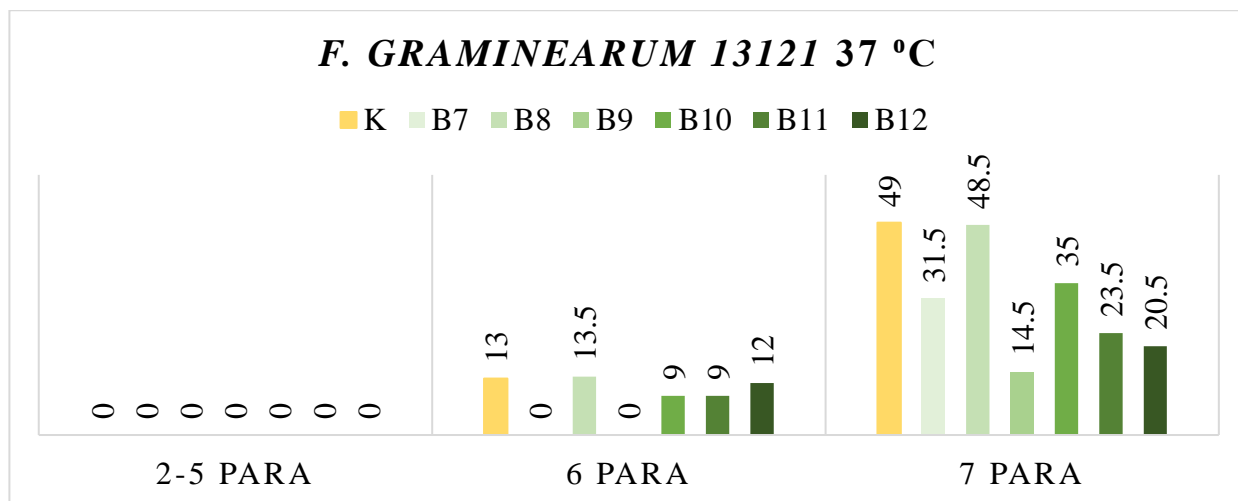
**3.6 pav.** *Fusarium graminearum* 13121 slopinimas iš dirvožemio išskirtų *Bacillus spp.* bakterijų poveikyje, auginant 25 °C temperatūroje, mm

Mėginiai su bakterijų kultūromis: B<sub>7</sub> – 022-3; B<sub>8</sub> – 022-4; B<sub>9</sub> – 2-1; B<sub>10</sub> – 4-2; B<sub>11</sub> – 8-1; B<sub>12</sub> – 022-4

Norint įvertinti ar padidinus inkubavimo temperatūrą sporinės bakterijos turės didesnės įtakos fitopatogeninių grybų slopinimui, tolimesni tyrimai vykdyti pakėlus inkubavimo temperatūrą iki optimalios bakterijų augimo temperatūros, t.y. iki 37 °C.

3.8 paveiksle pateikiami *F. graminearum* 13121 fitopatogeninio grybo augimo iš dirvožemio išskirtų bakterijų poveikyje, inkubuojant 37 °C temperatūroje duomenys. Remiantis pateiktais duomenimis, buvo nustatyta, kad šis patogeninis grybas prie 37 °C temperatūros per pirmąsias penkias paras nepradėjo augti. Pirmasis grybo augimas buvo užfiksuotas šeštą parą. Kontrolė užaugo iki 13 mm skersmens, o mėginiuose B<sub>10</sub>, B<sub>11</sub> ir B<sub>12</sub>, 9 mm, 9 mm ir 12 mm atitinkamai, patogenas buvo mažesnio skersmens, tai reiškia, kad grybas buvo slopinamas. Septintąją parą (paskutinė matavimo para iki tyrimas buvo sustabdomas) kontrolinėse lėkštelėse augantis *F. graminearum* 13121 išaugo iki 49 mm skersmens, o visuose kituose mėginiuose, kurie augo tiriamųjų bakterijų poveikyje, nustatytas patogeno slopinimas. Stipriausiai buvo slopinamas patogenas augantis B<sub>3</sub> mėginyje – 14,5 mm, kiek silpniau, patogenas buvo slopinamas mėginiuose: B<sub>7</sub>, B<sub>10</sub>, B<sub>11</sub> ir B<sub>12</sub> – 31,5 mm, 35 mm, 23,5 mm ir 20,5 mm atitinkamai. Mažiausias slopinimas buvo fiksuojamas B<sub>8</sub> mėginyje, patogeno skersmuo augant šiame mėginyje buvo vos 0,5 mm mažesnis nei augančio kontrolinėse lėkštelėse.

Atlikus šį tyrimą, galima teigti, kad 37 °C temperatūra nebuvo palanki fitopatogeninio grybo augimui.

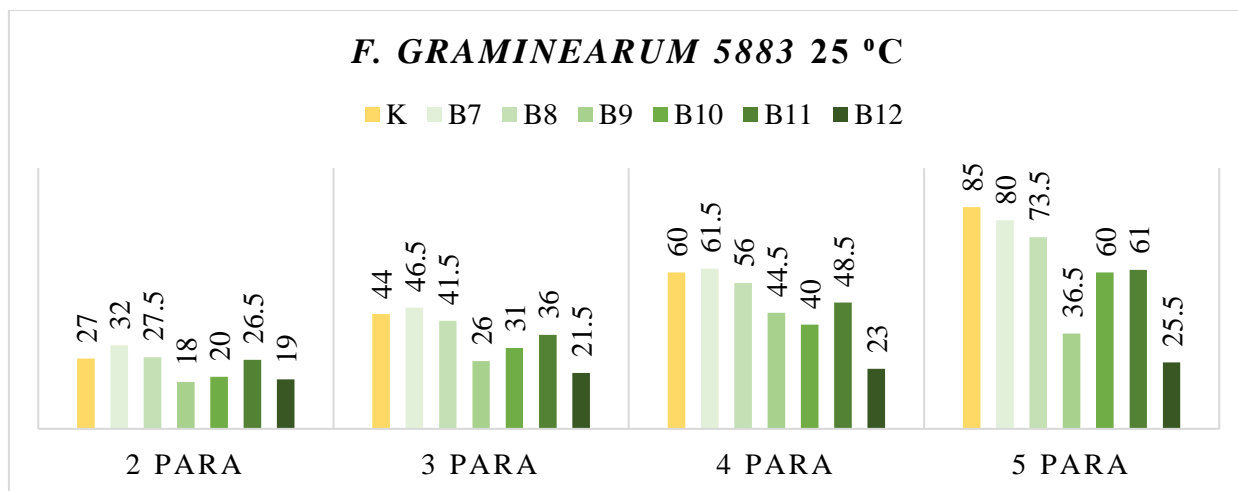


**3.7 pav.** *Fusarium graminearum* 13121 slopinimas iš dirvožemio išskirtų *Bacillus spp.* bakterijų poveikyje, auginant 37 °C temperatūroje, mm

Mėginiai su bakterijų kultūromis: B<sub>7</sub> – 022-3; B<sub>8</sub> – 022-4; B<sub>9</sub> – 2-1; B<sub>10</sub> – 4-2; B<sub>11</sub> – 8-1; B<sub>12</sub> – 022-4

### 3.5.2. *Fusarium graminearum* 5883 slopinimas inkubuojant 25 °C ir 37 °C kartu su iš dirvožemio išskirtomis *Bacillus spp.* bakterijomis

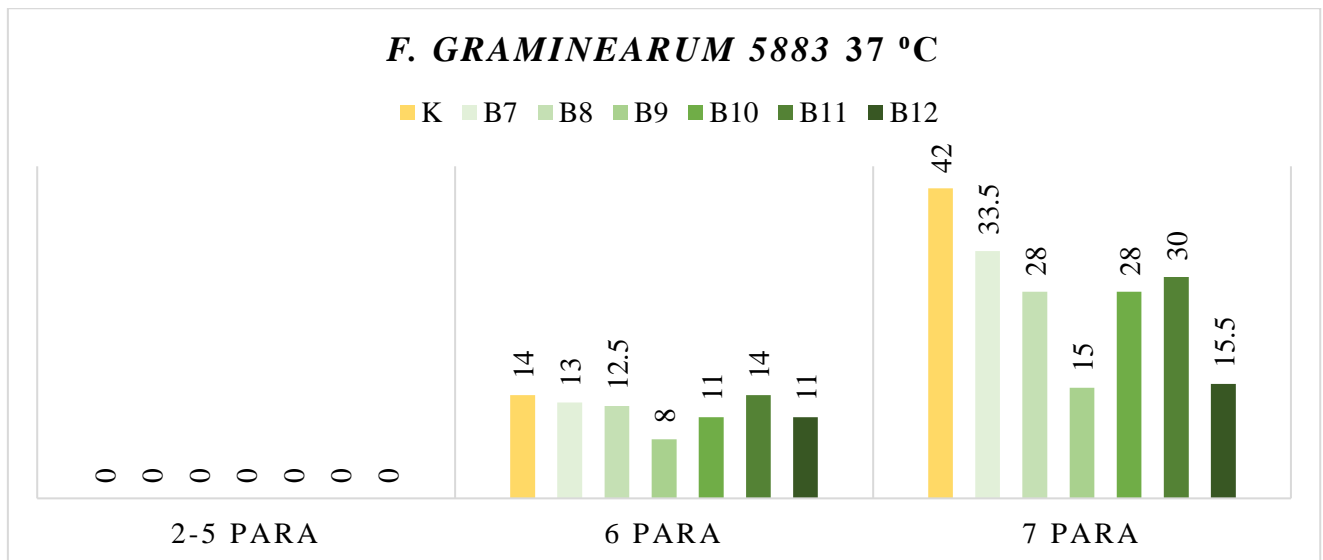
Žemiau 3.9 paveiksle, pateikiami *Fusarium graminearum* 5883 augančio prie 25 °C temperatūros duomenys.



**3.8 pav.** *Fusarium graminearum* 5883 slopinimas iš dirvožemio išskirtų *Bacillus spp.* bakterijų poveikyje, auginant 35 °C temperatūroje, mm

Mėginiai su bakterijų kultūromis: B<sub>7</sub> – 022-3; B<sub>8</sub> – 022-4; B<sub>9</sub> – 2-1; B<sub>10</sub> – 4-2; B<sub>11</sub> – 8-1; B<sub>12</sub> – 022-4

Matavimas buvo pradamas po dviejų parų inkubavimo termostate 25 °C temperatūroje. Po dviejų parų, grybo augimo slopinimas buvo nustatytas B<sub>9</sub>, B<sub>10</sub>, B<sub>11</sub> ir B<sub>12</sub> mėginiuose. Mėginyje B<sub>7</sub> ir B<sub>8</sub> (022-3 ir 022-4 bakterijos), fitopatogeno skersmuo buvo nustatytas didesnis nei kontrolinėse lėkštelėse. Trečios, ketvirtos ir penktos paros matavimo metu, matomas stiprus patogeno slopinimas bakterijų B<sub>9</sub> ir B<sub>12</sub> poveikyje, bakterijų B<sub>8</sub>, B<sub>9</sub> ir B<sub>10</sub> poveikyje - vidutinio stiprumo slopinimas. Mėginyje su bakterija B<sub>7</sub> silpnas slopinimas nustatytas tik paskutinę matavimo parą – penktąją.



**3.9 pav.** *Fusarium graminearum* 5883 slopinimas iš dirvožemio išskirtų *Bacillus spp.* bakterijų poveikyje, inkubuojant 37 °C temperatūroje, mm

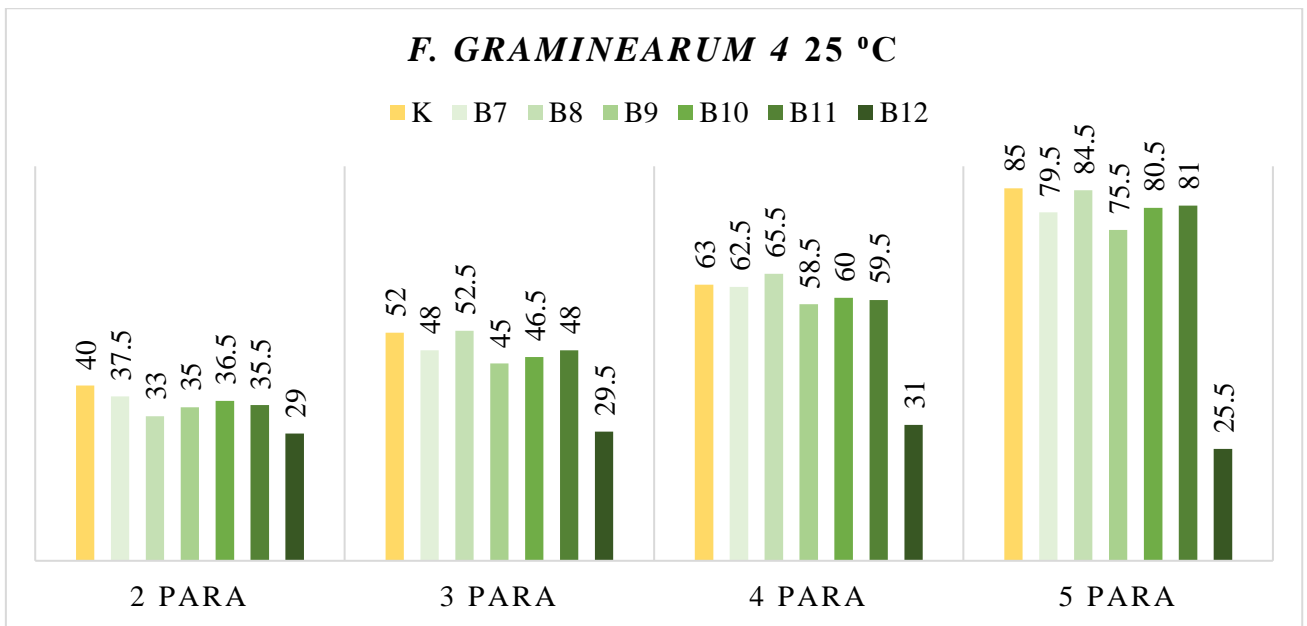
Mėginiai su bakterijų kultūromis: B<sub>7</sub> – 022-3; B<sub>8</sub> – 022-4; B<sub>9</sub> – 2-1; B<sub>10</sub> – 4-2; B<sub>11</sub> – 8-1; B<sub>12</sub> – 022-4

3.10 paveiksle matomi rezultatai lyginami atliktame slopinimo tyrime inkubuojant 25 °C ir prie 37 °C temperatūrose. Patogeninis grybas *F. graminearum* 5883, inkubuojant 37 °C temperatūroje, priešingai nei 25 °C temperatūroje, pirmąsias penkias paras neparodė jokio augimo rezultato, tik šestąją parą buvo fiksuojamas pirmasis augimas. Kontrolė užaugo iki 14 mm skersmens, o mažiausiai užaugęs mėginys buvo su bakterija B<sub>9</sub> – 8 mm. Likę mėginiai buvo silpnai arba visai neslopinami. Septintą parą buvo pastebimas didesnis fitopatogeninių grybų augimo pokytis. Kontrolė užaugo iki 42 mm skersmens. Mažiausiai patogeninį grybą slopino B<sub>7</sub> ir B<sub>11</sub> mėginiuose esančios bakterijos – 33,5 mm ir 30 mm atitinkamai, lyginant su kontroline grupe. Mėginiai su bakterijomis B<sub>8</sub> ir B<sub>10</sub> buvo identifikuojami kaip vidutiniškai slopinantys fitopageninį grybą, o stipriausias slopinimas buvo fiksuojamas mėginiuose su B<sub>9</sub> ir B<sub>12</sub> bakterijomis.

Atlikus tyrimą lyginant augimo skirtumą inkubuojant fitopatogeninį *F. graminearum* 5883 grybą prie skirtingų temperatūrų, galime teigti, kad didesnė temperatūra (37 °C) labiau slopino grybo augimą ir vystymąsi, nei žemesnė (25 °C).

### 3.5.3. *Fusarium graminearum* 4 slopinimas iš dirvožemio išskirtomis *Bacillus spp.* bakterijų poveikyje, inkubuojant 25 ir 37 °C temperatūroje

3.11 paveiksle pateikiami *Fusarium graminearum* 4 inkubuoto prie 25 °C temperatūroje slopinimo rezultatai.

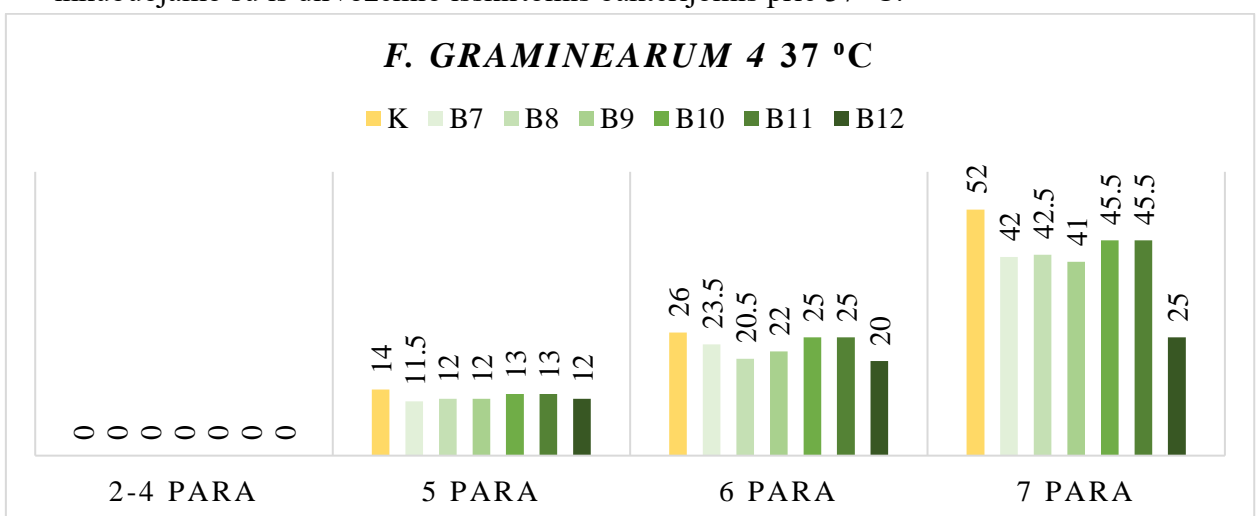


**3.10 pav.** *Fusarium graminearum* 4 slopinimas iš dirvožemio išskirtų *Bacillus spp.* bakterijų poveikyje, inkubuojant 25 °C temperatūroje, mm

Mėginiai su bakterijų kultūromis: B<sub>7</sub> – 022-3; B<sub>8</sub> – 022-4; B<sub>9</sub> – 2-1; B<sub>10</sub> – 4-2; B<sub>11</sub> – 8-1; B<sub>12</sub> – 022-4

Antrąją tyrimo parą, nustatyta, kad visi bakterijų mėginiai slopino fitopatogeninio *F. graminearum* 4 augimą. Trečiąją parą, vienintelis mėginys su B<sub>8</sub> bakterija, buvo 0,5 mm didesnis nei kontrolinė grupė – 52 mm. Visuose likusiuose mėginiuose, buvo fiksuojamas patogeninio grybo slopinimas lyginant su kontroline grupe. Stipriausiai buvo slopinamas mėginio B<sub>12</sub> – 29,5 mm. Ketvirtąją ir penktąją parą slopinimai buvo panašių reikšmių lyginant su kontroline grupe, išskyrus B<sub>12</sub> mėginio, slopinimas šiame mėginyje pasireiškė itin stipriau. Ketvirtą parą 31 mm lyginant su kontroline grupe 63 mm ir penktą parą 25,5 mm lyginant su 85 mm. Po tyrimo, galime teigti, kad bakterijos turėjo didesnę įtaką fitopatogeninio grybo augimui, nei temperatūra.

3.12 paveiksle pateikiami *Fusarium graminearum* 4 fitopatogeninio grybo slopinimo rezultatai inkubuojamo su iš dirvožemio išskirtomis bakterijomis prie 37 °C.

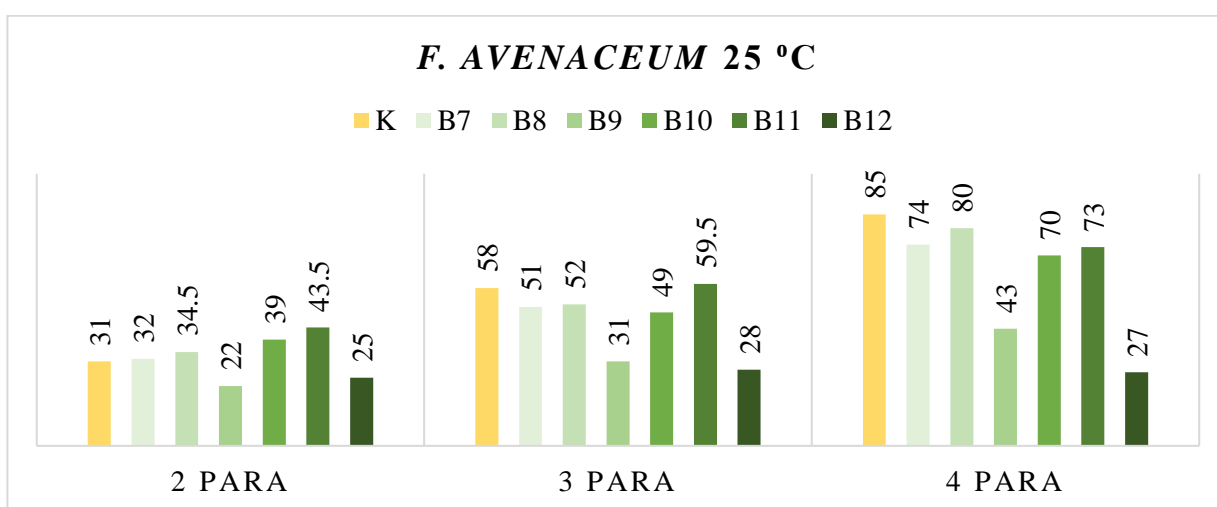


**3.11 pav.** *Fusarium graminearum* 4 slopinimas iš dirvožemio išskirtų *Bacillus spp.* bakterijų poveikyje, inkubuojant 37 °C, mm

Mėginiai su bakterijų kultūromis: B<sub>7</sub> – 022-3; B<sub>8</sub> – 022-4; B<sub>9</sub> – 2-1; B<sub>10</sub> – 4-2; B<sub>11</sub> – 8-1; B<sub>12</sub> – 022-4

Inkubuojant mėginius 37 °C temperatūroje, jų augimas pirmąsias keturias paras nebuvo fiksuojamas. Penktąją parą buvo atlikti pirmieji matavimai. Kontrolės skersmuo po penkių augimo parų buvo 14 mm, likusiuose mėginiuose buvo matyti silpnas fitopatogeno slopinimo rezultatas. Šeštąją parą, buvo nustatyta, kad kontrolės skersmuo padidėjo iki 26 mm, o daugiausiai fitopatogeną slopinančios bakterijos buvo B<sub>8</sub> ir B<sub>12</sub> mėginiuose, patogeninio grybo skersmuo mėginyje siekė 20,5 mm ir 20 mm atitinkamai. Septintąją parą, buvo nustatyta, kad B<sub>12</sub> mėginyje esanti bakterija labai stipriai slopino fitopatogeninį grybą, leisdamą jam užaugti iki 25 mm, kai kontrolėje augantis grybas pasiekė 52 mm skersmenį. Likusiuose mėginiuose taip pat buvo nustatytas silpnai vidutinis slopinimas.

### 3.5.4. *Fusarium avenaceum* slopinimas iš dirvožemio išskirtų *Bacillus spp.* bakterijų poveikyje, inkubuojant 25 °C temperatūroje

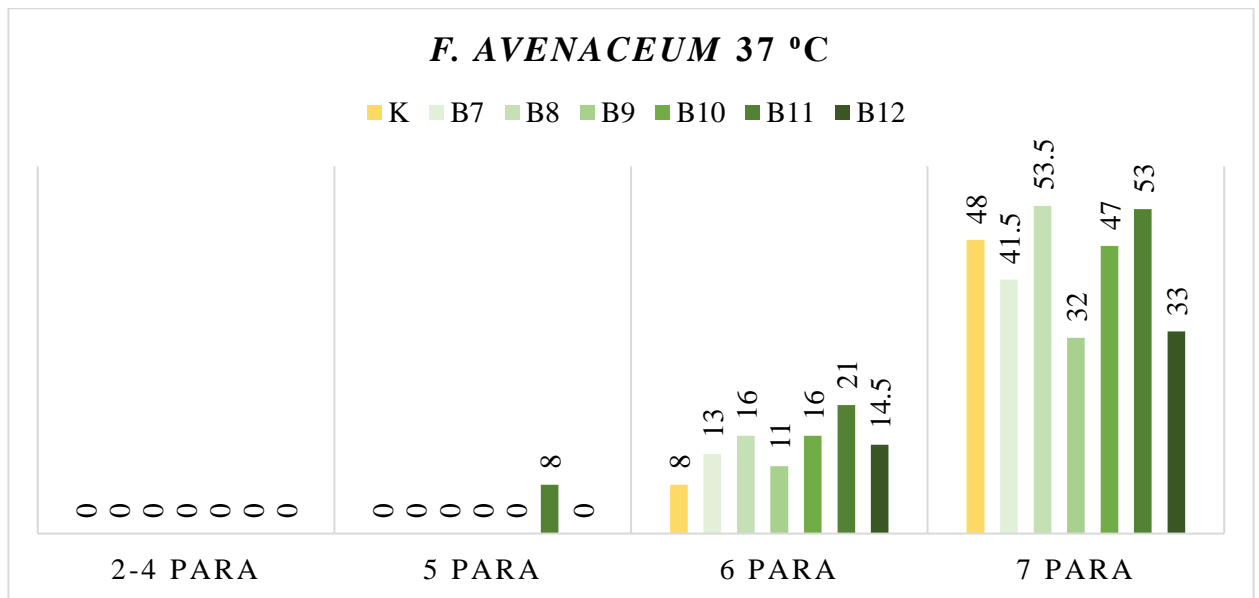


3.12 pav. *Fusarium avenaceum* slopinimas iš dirvožemio išskirtų *Bacillus spp.* bakterijų poveikyje, inkubuojant 25 °C temperatūroje, mm

Mėginiai su bakterijų kultūromis: B<sub>7</sub> – 022-3; B<sub>8</sub> – 022-4; B<sub>9</sub> – 2-1; B<sub>10</sub> – 4-2; B<sub>11</sub> – 8-1; B<sub>12</sub> – 022-4

3.13 paveiksle pateikiami bakterijų kultūrų slopinančių *Fusarium avenaceum* patogeninio grybo augimą rezultatai prie 25 °C. Antrąją parą kontrolėje buvo nustatytas 31 mm fitopatogeninio grybo skersmuo. Lyginant šį rezultatą su kitais, tuo pačiu metu matuotais mėginiais, buvo nustatyta, kad tik du mėginiai slopino grybą po dviejų parų – B<sub>9</sub> ir B<sub>12</sub> mėginiuose esančios bakterijos. Grybų augančių kartu su šiomis bakterijomis vidutinis skersmuo buvo 22 mm ir 26 mm atitinkamai. Likusios bakterijos fitopatogeninio grybo neslopino, priešingai, jis užaugo didesnis, nei kontrolinėje grupėje. Lyginant trečiosios paros rezultatus, tos pačios dvi bakterijos B<sub>9</sub> ir B<sub>12</sub> labiausiai slopino grybo augimą, tačiau po trijų parų, tik vienas mėginys B<sub>11</sub> (59,5 mm), buvo didesnis už kontrolinę grupę (58 mm). Ketvirtosios paros rezultatuose kontrolinės grupės mėginys pasiekė maksimumą, t.y. 85 mm. Šio matavimo metu, remiantis nurodytais rezultatais, galime teigti, kad visuose mėginiuose buvo nustatytas fitopatogeninio grybo slopinimas. Daugiausiai buvo slopinama B<sub>9</sub> ir B<sub>12</sub> mėginiuose - 43 mm ir 27 mm atitinkamai, o mažiausiai slopinama B<sub>8</sub> mėginyje esančių bakterijų.





**3.13 pav.** *Fusarium avenaceum* slopinimas iš dirvožemio išskirtų *Bacillus spp.* bakterijų poveikyje, inkubuojant 37 °C temperatūroje, mm

Mėginiai su bakterijų kultūromis: B<sub>7</sub> – 022-3; B<sub>8</sub> – 022-4; B<sub>9</sub> – 2-1; B<sub>10</sub> – 4-2; B<sub>11</sub> – 8-1; B<sub>12</sub> – 022-4

Rezultatai po mėginių inkubavimo 37 °C temperatūroje (3.14 pav). Pirmąsias keturias paras, mėginiai terpėje neaugo, tik penktąją parą, vienintelis mėginys B<sub>11</sub> išaugo iki 5 mm skersmens. Po šešių inkubavimo parų buvo fiksuojami visų mėginių augimo rezultatai. Kontrolės skersmuo buvo 8 mm, kadangi tai buvo mažiausias iš visų matuotų mėginių, grybo slopinimo šeštąją parą nebuvo. Tik po septynių parų, mėginiuose buvo fiksuojamas žymus augimas. Kontrolinės grupės skersmuo buvo 48 mm, silpnai vidutinis patogeno slopinimas nustatytas mėginyje B<sub>7</sub> – 41,5 mm, stiprus slopinimas B<sub>9</sub> mėginyje – 32 mm, B<sub>10</sub> mėginyje silpnas slopinimas – 47 mm, B<sub>12</sub> – 33 mm, stiprus slopinimas. Mėginiai B<sub>8</sub> ir B<sub>11</sub> slopinimu nepasižymėjo, nes juose fitopatogeninio grybo skersmuo buvo didesnis nei kontrolinėje grupėje. Atlikus šį tyrimą, galime teigti, kad fitopatogeninio grybo *Fusarium avenaceum* augimui įtakos turėjo tiek aukšta temperatūra (37 °C), tiek bakterijos augančios kartu vienoje terpėje.



#### 4. Rekomendacijų dalis

Tyrimo metu buvo išskirtos bakterijų kultūros iš dirvožemio ir tirtos jų antagonistinės savybės prieš augalų fitopatogeninius grybus – *F. graminearum* 13121, *F. graminearum* 5883, *F. graminearum* 4, *F. avenaceum* ir *A. flavus*. Norint gauti tikslesnius duomenis, rekomenduotina atlikti bakterijų iš dirvožemio molekulinį gryninimą. Išskirti bakterijų DNR seką, palyginti ją su literatūroje randama bakterijų DNR sekų informacija ir taip konkrečiai identifikuoti bakterijas, kurios buvo išskirtos iš dirvožemio. Tokie tyrimai nebuvo atliekami šiame darbe dėl įrangos trūkumo, tačiau turint galimybę geriau pasiruošti šiems tyrimams, būtų galima gauti tikslesnius rezultatus.

Norint nustatyti tikslesnę antagonistinę bakterijų išskirtų iš dirvožemio slopinimo poveikį prieš fitopatogeninius grybus, taip pat rekomenduojama atlikti jų išskiriamų mikotoksinų kiekių nustatymą. Būtų nustatomi mikotoksinų išskiriami kiekiai normaliomis sąlygomis ir kuomet patogeninis grybas yra slopinamas bakterijų. Gauti rezultatai palyginami ir nustatoma ar bakterija slopino tik grybo micelio augimą ar tuo pačiu ir išskiriamų į aplinką mikotoksinų kiekius. Šie darbai pareikalautų daugiau išteklių ir laiko, todėl tyrimus būtų galima tęsti doktorantūros studijų metu.

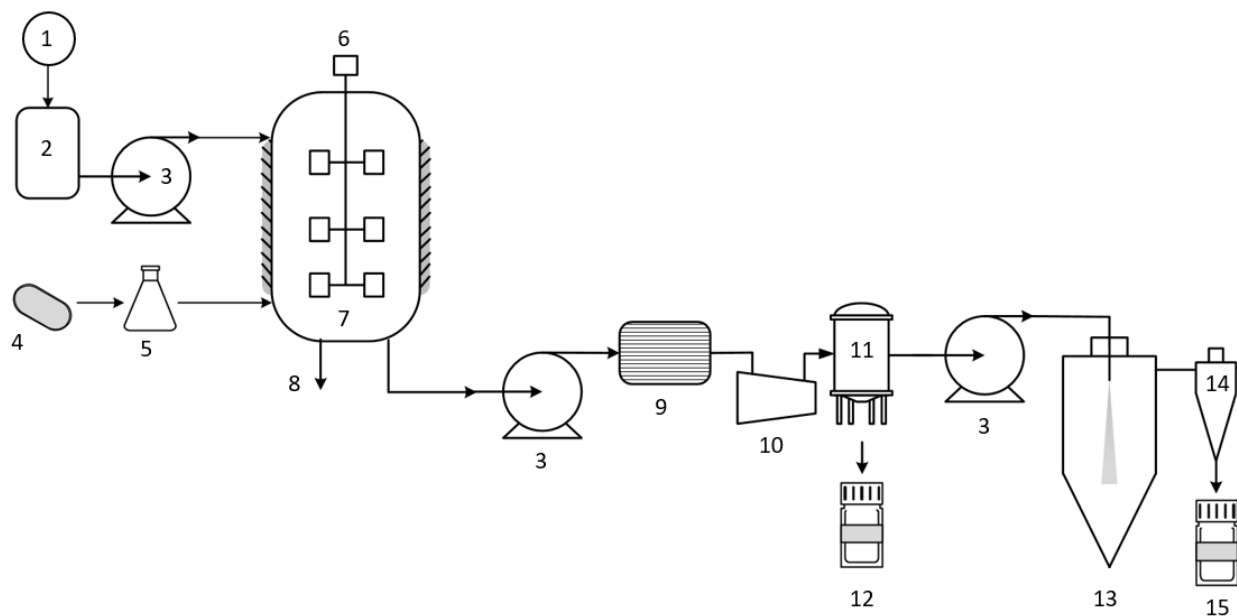
Kadangi nemaža dalis bakterijų pasižymėjo antagonistiniu aktyvumu prieš fitopatogeninius grybus, būtų galima tęsti tyrimus su naujomis bakterijų kultūromis, kad būtų kuo daugiau iširtų bakterijų ir jų santykis su fitopatogeniniais grybais.

Atlikus šiuos tyrimus laboratorijos sąlygomis, būtų galima juo bandyti atkartoti *in vivo* sąlygomis, kad patikrinti tikrąjį jų aktualumą ir svarbą biotechnologijų pramonėje. Kadangi atliekant lauko sąlygomis šiuos tyrimus, atsiranda daugiau veiksnių, kurie turi įtakos tiek grybo tiek bakterijos augimui. Gautus rezultatus galima būtų palyginti su *in vitro* atliktais tyrimų rezultatais ir pritaikyti gautus rezultatus pramoninei gamybai.

Biotrašų gamybos procesas pradedamas mitybinę terpę (nr. 1) supilant į autoklavą (nr. 2). Naudojantis siurbliais, sterili mitybinė terpė perpumpuojama į fermentatorių (nr. 7). Tirta bakterijų kultūrą (*Bacillus spp.* – B<sub>12</sub>) (nr. 4) yra sumaišoma su buferiniu tirpalu kolbutėje (nr. 5) ir siurbliais perpumpuojama kartu į fermentatorių. Tinkama temperatūra, laikas yra nustatoma valdymo skydelyje (nr. 6). Bakterijų kultūrų suspensija fermentuojama 24 – 72 h, prie 37 °C temperatūros. Procesui taikoma nepertraukiamos fermentacijos technologija (angl. fed batch fermentation), kurios metu, įvairiomis papildomomis maistinėmis medžiagomis yra papildomos fermentatoriuje augančios bakterijų kultūros. Fermentacijos metu ar jos pabaigoje per atliekų angą (nr. 8) gali būti pašalinami fermentacijos metu susidarę antriniai metabolitai ar kiti nepageidaujami produktai arba utilizuojami ir tapdami kito fermentatoriaus inokuliantu. Po fermentacijos bakterijų suspensija keliauja pro filtrus, kad būtų atskiriamos didesnės auginimo terpės sankaupos. Po filtracijos, bakterijų suspensija pumpuojama į gryninimą t.y., centrifugavimą (nr. 10). Suspensijoje esančios bakterijos centrifugos pagalba yra nusodinamos, kad būtų lengvesnis jų atskyrimas. Po šio proceso galima toliau gaminti du skirtingus produktus: koncentruotas skystas bakterijų suspensijas arba (ir) sausą bakterijų kultūros biomasę. Gaminant koncentruotas skystas bakterijų suspensijas, po centrifugavimo suspensijos perkeliama į rezervuarą (nr. 11), iš kurio gali būti pašalinama dalis vandens ir koncentruota bakterijų suspensija ( $1 \times 10^{11}$  KSV/ml) gali būti išpilstomas į tarą ir realizuojamas (nr. 12). Gaminant sausą bakterijų biomasę, yra taikomas „spray drying“ procesas, kurio metu siurblys pompuoja iš rezervuaro (nr. 11) koncentruotą bakterijų suspensiją į purštuvinę džiovyklą (nr. 13), iš kurios garų pavidalu bakterijų biomasė yra nukreipiama į cikloninį separavimą (nr. 14). Sausa bakterijų biomasė (nr. 15) gali būti sumaišoma ir naudojama kartu su durpėmis tręšiant laukus arba vermikulito pavidalu.

**4.1 lentelė.** Aparatūrinės schemos dalys

Numeris	Pavadinimas
1	Mitybinė terpė
2	Autoklavas
3	Siurblys
4	Bakterijų kultūra
5	Kolbutė
6	Valdymo skydelis
7	Fermentatorius
8	Atliekos
9	Filtras
10	Centrifuga
11	Rezervuaras
12	Skysta bakterijų suspensija
13	Purškiamasis džiovintuvas (angl. spray drying)
14	Cikloninis separavimas (angl. Cyclone separation)
15	Sausas bakterijų preparatas



**4.1 pav.** Aparatūrinė biotrašų schema

## Išvados

1. Iš dirvožemio buvo išskirtos sporas formuojančios rizobakterijos, atlikus Gram'o dažymo, biocheminius identifikacinius metodus, nustatyta, kad visos (022-3, 022-4, 2-1, 4-2, 8-1, 8-2) bakterijos turi *Bacillus spp.* bakterijų genčiai būdingus požymius, tokius kaip: gram-teigiamos, aerobinės, ovalios formos, sporas formuojančios, ureazės fermentų neturinčios bakterijos. Katalazės fermentus turėjo visos bakterijos, bet tik dalis (022-4, 4-2, 8-2) bakterijų gebėjo hidrolizuoti krakmolą.
2. Tyrimo metu nustatyta, kad *Fusarium graminearum* 4 fitopatogeninis grybas buvo efektyviai slopinamas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>7</sub>, B<sub>8</sub>, B<sub>10</sub>, B<sub>12</sub> mėginiuose, kuriuose buvo etaloninių ir iš dirvožemio išskirtų bakterijų. B<sub>5</sub>, B<sub>9</sub> ir B<sub>11</sub> mėginiai turėjo neigiamą slopinimo koeficientą – grybo augimas buvo skatinamas. *Fusarium avenaceum* fitopatogeninis grybas efektyviausiai buvo slopinamas B<sub>1</sub>, B<sub>7</sub> ir B<sub>11</sub> bakterijų kultūrų mėginių. Fitopatogeninis *Fusarium graminearum* 13121 grybas buvo slopinamas stipriausiai, palyginus su kitais tirtais fitopatogeniniais grybais. Tiriant *Fusarium graminearum* 5883 fitopatogeninio grybo slopinimą, buvo nustatyta, kad jį efektyviai slopino visi bakterijų mėginiai.
3. Inkubuojant mėginius 25 °C temperatūroje, fitopatogeniai grybai buvo stipriausiai slopinami B<sub>12</sub> mėginyje, likusiuose mėginiuose slopinimas buvo silpnas. Inkubuojant 37 °C temperatūroje, buvo nustatyta, kad aukštesnė temperatūra neigiamai veikia fitopatogenų augimą. *F. graminearum* 13121 ir *F. graminearum* 5883 pradėjo augti tik po penkių parų, likusias dvi paras, jie buvo efektyviai slopinami visų bakterijų mėginių. *F. graminearum* 4 ir *F. avenaceum* pradėjo augti po keturių parų, per likusias tris tyrimo paras fitopatogenai buvo stipriai slopinami B<sub>12</sub> mėginyje esančių bakterijų kultūrų.
4. Ištyrus iš dirvožemio išskirtų *Bacillus spp.* bakterijų galimybes skatinti augalų augimą, galima teigti, kad vasarinių kviečių sėklų apdorojimas bakterijų suspensijomis, turėjo teigiamos įtakos augalo išdygimui, susidariusių lapelių skaičiui, bei paties augalo svoriui.

## Literatūros sąrašas

1. SUMBUL, A. ANSARI, R.A. RIZVI, R. and MAHMOOD, I. Azotobacter: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020, Vol. 27, no. 12, p. 3634–3640. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.004>>.
2. SHAFI, J. TIAN, H. and JI, M. Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* [interaktyvus]. 2017, Vol. 31, no. 3, p. 446–459. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>>.
3. RIAZ, U. MURTAZA, G. ANUM, W. SAMREEN, T. SARFRAZ, M. and NAZIR, M.Z. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Biofertilizers and Biopesticides BT - Microbiota and Biofertilizers: A Sustainable Continuum for Plant and Soil Health. In: HAKEEM, K.R. et al. *Sud. [interaktyvus]*. Cham: Springer International Publishing. 2021, p. 181–196. ISBN 978-3-030-48771-3. Prieiga per internetą: <[https://doi.org/10.1007/978-3-030-48771-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-48771-3_11)>.
4. BENDER, S.F. WAGG, C. and HEIJDEN, M.G.A. VAN DER An Underground Revolution: Biodiversity and Soil Ecological Engineering for Agricultural Sustainability. *Trends in Ecology & Evolution*. 2016, Vol. 31, no. 6, p. 440–452. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.02.016>>.
5. BARDGETT, R.D. and PUTTEN, W.H. VAN DER Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature* 2014 515:7528 [interaktyvus]. 2014, Vol. 515, no. 7528, p. 505–511. [žiūrėta 2023-04-20]. Prieiga per internetą: <<https://www.nature.com/articles/nature13855>>.
6. LONG, P.E. WILLIAMS, K.H. HUBBARD, S.S. and BANFIELD, J.F. Microbial Metagenomics Reveals Climate-Relevant Subsurface Biogeochemical Processes. *Trends in Microbiology*. 2016, Vol. 24, no. 8, p. 600–610. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.04.006>>.
7. KUZYAKOV, Y. and BLAGODATSKAYA, E. Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. *Soil Biology and Biochemistry*. 2015, Vol. 83, p. 184–199. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.025>>.
8. YAHYA, G. and et al. Soil-Associated Bacillus Species: A Reservoir of Bioactive Compounds with Potential Therapeutic Activity against Human Pathogens. *Microorganisms*. 2021, Vol. 9, no. 6. Prieiga per internetą: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34073963/>>.
9. BEN-NOAH, I. and FRIEDMAN, S.P. Review and Evaluation of Root Respiration and of Natural and Agricultural Processes of Soil Aeration. *Vadose Zone Journal* [interaktyvus]. 2018, Vol. 17, no. 1, p. 170119. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.2136/vzj2017.06.0119>>.
10. BEN-NOAH, I. and FRIEDMAN, S.P. Bounds to Air-Flow Patterns during Cyclic Air Injection into Partially Saturated Soils Inferred from Extremum States. *Vadose Zone Journal* [interaktyvus]. 2019, Vol. 18, no. 1, p. 180023. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.2136/vzj2018.01.0023>>.
11. BEN-NOAH, I. NITSAN, I. COHEN, B. KAPLAN, G. and FRIEDMAN, S.P. Soil aeration using air injection in a citrus orchard with shallow groundwater. *Agricultural Water Management* [interaktyvus]. 2021, Vol. 245, p. 106664. Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378377420322083>>.

12. BEN-NOAH, I. NITSAN, I. and FRIEDMAN, S.P. Forced and natural gas movement in dry sand – Barrel experiments and models. *Soil Science Society of America Journal* [interaktyvus]. 2020. Vol. 84, no. 2, p. 425–442. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1002/saj2.20042>>.
13. THYNNE, E. SAUR, I.M.L. SIMBAQUEBA, J. OGILVIE, H.A. GONZALEZ-CENDALES, Y. MEAD, O. TARANTO, A. CATANZARITI, A.-M. MCDONALD, M.C. SCHWESSINGER, B. JONES, D.A. RATHJEN, J.P. and SOLOMON, P.S. Fungal phytopathogens encode functional homologues of plant rapid alkalization factor (RALF) peptides. *Molecular Plant Pathology* [interaktyvus]. 2017, Vol. 18, no. 6, p. 811–824. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1111/mpp.12444>>.
14. SOYER, J.L. HAMIOT, A. OLLIVIER, B. BALESDENT, M.-H. ROUXEL, T. and FUDAL, I. The APSES transcription factor LmStuA is required for sporulation, pathogenic development and effector gene expression in *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Plant Pathology* [interaktyvus]. 2015, Vol. 16, no. 9, p. 1000–1005. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1111/mpp.12249>>.
15. SHRUTHI, U. NAGAVENI, V. and RAGHAVENDRA, B.K. A Review on Machine Learning Classification Techniques for Plant Disease Detection. *2019 5th International Conference on Advanced Computing & Communication Systems (ICACCS)*. 2019. p. 281–284. .
16. LASINSKAITĖ-ČERKAŠINA, Aldona, Alvydas Pavilionis ir Vytautas Vaičiuvėnas. *Medicinos Mikrobiologija ir virusologijos pagrindai*. Kaunas: Kauno medicinos universitetas. ISBN 9955686014.
17. FISHER, M.C. HENK, D.A. BRIGGS, C.J. BROWNSTEIN, J.S. MADOFF, L.C. MCCRAW, S.L. and GURR, S.J. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* [interaktyvus]. 2012, Vol. 484, no. 7393, p. 186–194. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1038/nature10947>>.
18. SAVARY, S. FICKE, A. AUBERTOT, J.-N. and HOLLIER, C. Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security* [interaktyvus]. 2012, Vol. 4, no. 4, p. 519–537. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1007/s12571-012-0200-5>>.
19. CASADEVALL, A. Don't Forget the Fungi When Considering Global Catastrophic Biorisks. *Health Security* [interaktyvus]. 2017, Vol. 15, no. 4, p. 341–342. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1089/hs.2017.0048>>.
20. VENKATESH, N. and KELLER, N.P. Mycotoxins in Conversation With Bacteria and Fungi [interaktyvus]. 2019, vol. 10. Prieiga per internetą: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00403>>.
21. PITT, J.I. and MILLER, J.D. A Concise History of Mycotoxin Research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2017, Vol. 65, no. 33, p. 7021–7033. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04494>>.
22. KAZLAUSKAITĖ, Sonata. *Želdinių Apsauga: mokomoji knyga*. Kaunas: Aleksandro Stulginskio universitetas, 2013. ISBN 9876094490460. Prieiga per internetą: <<http://dspace.lzuu.lt/handle/1/2579>>.
23. D., R.-N.A. J., K.B. ELEFThERIOS, M. and PETER, B. Cross-Domain and Viral Interactions

- in the Microbiome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [interaktyvus]. 2019, Vol. 83, no. 1, p. e00044-18. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1128/MMBR.00044-18>>.
24. WANG, Q. VERA BUXA, S. FURCH, A. FRIEDT, W. and GOTTWALD, S. Insights Into Triticum aestivum Seedling Root Rot Caused by Fusarium graminearum. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® [interaktyvus]. 2015, Vol. 28, no. 12, p. 1288–1303. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1094/MPMI-07-15-0144-R>>.
25. BAI, G. and SHANER, G. Management and resistance in wheat and barley to fusarium head blight. In: *Annual review of phytopathology*. 2004, Vol. 42, p. 135–161.
26. PITT, J.I. Mycotoxins: Deoxynivalenol and Other Trichothecenes. MOTARJEMI, Y.B.T.-E. of F.S.Sud. [interaktyvus]. Waltham: Academic Press. 2014, p. 295–298. ISBN 978-0-12-378613-5. Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123786128001931>>.
27. CHANG, K.F. CONNER, R.L. HWANG, S.F. AHMED, H.U. MCLAREN, D.L. GOSSSEN, B.D. and TURNBULL, G.D. Effects of seed treatments and inoculum density of Fusarium avenaceum and Rhizoctonia solani on seedling blight and root rot of faba bean. *Canadian Journal of Plant Science* [interaktyvus]. 2014, Vol. 94, no. 4, p. 693–700. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.4141/cjps2013-339>>.
28. KHALEDI, N. TAHERI, P. and FALAHATI RASTEGAR, M. Identification, virulence factors characterization, pathogenicity and aggressiveness analysis of *Fusarium spp.*, causing wheat head blight in Iran. *European Journal of Plant Pathology* [interaktyvus]. 2017, Vol. 147, no. 4, p. 897–918. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1007/s10658-016-1059-7>>.
29. STAKHEEV, A.A. KHAIRULINA, D.R. and ZAVRIEV, S.K. Four-locus phylogeny of Fusarium avenaceum and related species and their species-specific identification based on partial phosphate permease gene sequences. *International Journal of Food Microbiology* [interaktyvus]. 2016, Vol. 225, p. 27–37. Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160516300782>>.
30. THRANE, U. Fusarium. BATT, C.A. - TORTORELLO, M.L.B.T.-E. of F.M. (Second E.Sud). [interaktyvus]. Oxford: Academic Press. 2014, p. 76–81. ISBN 978-0-12-384733-1. Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300001415>>.
31. SAMSON, R.A. VISAGIE, C.M. HOUBRAKEN, J. HONG, S.-B. HUBKA, V. KLAASSEN, C.H.W. PERRONE, G. SEIFERT, K.A. SUSCA, A. TANNEY, J.B. VARGA, J. KOCSUBÉ, S. SZIGETI, G. YAGUCHI, T. and FRISVAD, J.C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus. *Studies in mycology*. 2014, Vol. 78, p. 141–173.
32. FRISVAD, J.C. HUBKA, V. EZEKIEL, C.N. HONG, S.-B. NOVÁKOVÁ, A. CHEN, A.J. ARZANLOU, M. LARSEN, T.O. SKLENÁŘ, F. MAHAKARNCHANAKUL, W. SAMSON, R.A. and HOUBRAKEN, J. Taxonomy of Aspergillus section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in mycology* . 2019. Vol. 93, p. 1–63.
33. KLICH, M.A. Aspergillus flavus: the major producer of aflatoxin. *Molecular plant pathology*. 2007, Vol. 8, no. 6, p. 713–722. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00436.x>

34. AMAIKE, S. and KELLER, N.P. *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology* [interaktyvus]. 2011, Vol. 49, no. 1, p. 107–133. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095221>>.
35. RUDRAMURTHY, S.M. PAUL, R.A. CHAKRABARTI, A. MOUTON, J.W. and MEIS, J.F. Invasive Aspergillosis by *Aspergillus flavus*: Epidemiology, Diagnosis, Antifungal Resistance, and Management. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*. 2019, Vol. 5, no. 3.
36. KRISHNAN, S. MANAVATHU, E.K. and CHANDRASEKAR, P.H. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses* [interaktyvus]. 2009, Vol. 52, no. 3, p. 206–222. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01642.x>>.
37. EBBOLE, D.J. The *Conidium*. *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi* [interaktyvus]. 2010, p. 577–590. ISBN 9781683671299. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1128/9781555816636.ch36>>.
38. BALTUSSEN, T.J.H. ZOLL, J. VERWEIJ, P.E. and MELCHERS, W.J.G. Molecular Mechanisms of Conidial Germination in *Aspergillus spp.* *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. 2020, Vol. 84, no. 1.
39. BLACHOWICZ, A. RAFFA, N. BOK, J.W. CHOERA, T. KNOX, B. LIM, F.Y. HUTTENLOCHER, A. WANG, C.C.C. VENKATESWARAN, K. and KELLER, N.P. Contributions of Spore Secondary Metabolites to UV-C Protection and Virulence Vary in Different *Aspergillus fumigatus* Strains. *mBio*. 2020, Vol. 11, no. 1.
40. LV, C. JIN, J. WANG, P. DAI, X. LIU, Y. ZHENG, M. and XING, F. Interaction of water activity and temperature on the growth, gene expression and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* on paddy and polished rice. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2019, Vol. 293, p. 472–478. Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814619308040>>.
41. LOGAN, N.A. and VOS, P. De *Bacillus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [interaktyvus]. 2015, p. 1–163. ISBN 9781118960608 Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530>>.
42. LIU, Y. LI, J. DU, G. CHEN, J. and LIU, L. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* fueled by systems biology: Recent advances and future directions. *Biotechnology Advances* [interaktyvus]. 2017, Vol. 35, no. 1, p. 20–30. Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975016301458>>.
43. SCHALLMEY, M. SINGH, A. and WARD, O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology* [interaktyvus]. 2004, Vol. 50, no. 1, p. 1–17. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1139/w03-076>>.
44. DIJL, J. VAN and HECKER, M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microbial Cell Factories* [interaktyvus]. 2013, Vol. 12, no. 1, p. 3. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-3>>.
45. CUI, W. HAN, L. SUO, F. LIU, Z. ZHOU, L. and ZHOU, Z. Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [interaktyvus]. 2018, Vol. 34, no. 10, p. 145. Prieiga per internetą:

<<https://doi.org/10.1007/s11274-018-2531-7>>.

46. CHERUKURI, P.K. SONGKIATISAK, P. DING, F. JAULT, J.-M. and XU, X.-H.N. Antibiotic Drug Nanocarriers for Probing of Multidrug ABC Membrane Transporter of *Bacillus subtilis*. *ACS Omega* [interaktyvus]. 2020, Vol. 5, no. 3, p. 1625–1633. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03698>>.
47. ACEVEDO-ROCHA, C.G. GRONENBERG, L.S. MACK, M. COMMICHAU, F.M. and GENEÉ, H.J. Microbial cell factories for the sustainable manufacturing of B vitamins. *Current Opinion in Biotechnology* [interaktyvus]. 2019, Vol. 56, p. 18–29. Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166918300740>>.
48. SUMI, C.D. YANG, B.W. YEO, I.-C. and HAHM, Y.T. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Canadian Journal of Microbiology* [interaktyvus]. 2014, Vol. 61, no. 2, p. 93–103. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0613>>.
49. AFSHARMANESH, H. PEREZ-GARCIA, A. ZERIOUH, H. AHMADZADEH, M. and ROMERO, D. Aflatoxin degradation by *Bacillus subtilis* UTB1 is based on production of an oxidoreductase involved in bacilysin biosynthesis. *Food Control* [interaktyvus]. 2018, Vol. 94, p. 48–55. Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713518300999>>.
50. ABBASNIAYZARE, S. SEDAGHATHOOR, S. and DAHKAE, M. Effect of Biofertilizer Application on Growth Parameters of *Spathiphyllum* illusion. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 2012, Vol. 12, p. 669–673.
51. ORTIZ, A. and SANSINENEA, E. Recent advancements for microorganisms and their natural compounds useful in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*. 2021, Vol. 105, no. 3, p. 891–897.
52. WONG, C.K.F. and TEH, C.-Y. Impact of Biofertilizers on Horticultural Crops. *Biofertilizers* [interaktyvus]. 2021, p. 39–103. ISBN 9781119724995. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1002/9781119724995.ch2>>.
53. PATHAK, D. V KUMAR, M. and RANI, K. Biofertilizer Application in Horticultural Crops BT - Microorganisms for Green Revolution: Volume 1: Microbes for Sustainable Crop Production. PANPATE, D.G. et al. *Sud.* [interaktyvus]. Singapore: Springer Singapore. 2017, p. 215–227. ISBN 978-981-10-6241-4. Prieiga per internetą: <[https://doi.org/10.1007/978-981-10-6241-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-10-6241-4_11)>.
54. LA FUENTE CANTÓ, C. DE SIMONIN, M. KING, E. MOULIN, L. BENNETT, M.J. CASTRILLO, G. and LAPLAZE, L. An extended root phenotype: the rhizosphere, its formation and impacts on plant fitness. *The Plant Journal* [interaktyvus]. 2020, Vol. 103, no. 3, p. 951–964. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1111/tpj.14781>>.
55. KHOSHROU, B. MITRA, D. KHOSHMANZAR, E. MYO, E.M. UNİYAL, N. MAHAKUR, B. MOHAPATRA, P.K. Das PANNEERSELVAM, P. BOUTAJ, H. ALIZADEH, M. CELY, M.V.T. SENAPATI, A. and RANI, A. Current scenario and future prospects of plant growth-promoting rhizobacteria: an economic valuable resource for the agriculture revival under stressful conditions. *Journal of Plant Nutrition* [interaktyvus]. 2020, Vol. 43, no. 20, p. 3062–3092. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1799004>>.



56. BASU, A. PRASAD, P. DAS, S.N. KALAM, S. SAYYED, R.Z. REDDY, M.S. and ENSHASY, H. EL. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects [interaktyvus]. 2021, vol. 13, no. 3, p. 1140. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.3390/su13031140>>.
57. MEDFU TAREKEGN, M. ZEWDU SALILIH, F. and ISHETU, A.I. Microbes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment. YILDIZ, F.Sud. *Cogent Food & Agriculture* [interaktyvus]. 2020, Vol. 6, no. 1, p. 1783174. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1783174>>.
58. FASUSI, O.A. CRUZ, C. and BABALOLA, O.O. Agricultural Sustainability: Microbial Biofertilizers in Rhizosphere Management [interaktyvus]. 2021, vol. 11, no. 2, p. 163. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.3390/agriculture11020163>>.
59. BHARDWAJ, D. ANSARI, M.W. SAHOO, R.K. and TUTEJA, N. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories* [interaktyvus]. 2014, Vol. 13, no. 1, p. 66. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-66>>.
60. NOSHEEN, S. AJMAL, I. and SONG, Y. Microbes as Biofertilizers, a Potential Approach for Sustainable Crop Production [interaktyvus]. 2021, vol. 13, no. 4, p. 1868. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.3390/su13041868>>.
61. GOVINDARAJAN, M. Larvicidal and repellent properties of some essential oils against *Culex tritaeniorhynchus* Giles and *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* [interaktyvus]. 2011, Vol. 4, no. 2, p. 106–111. Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764511600473>>.
62. STEVENSON, P.C. ISMAN, M.B. and BELMAIN, S.R. Pesticidal plants in Africa: A global vision of new biological control products from local uses. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. 2017, Vol. 110, p. 2–9. Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669017305459>>.
63. SPORLEDER, M. and LACEY, L.A. Chapter 16 - Biopesticides. ALYOKHIN, A. et al.Sud. [interaktyvus]. San Diego: Academic Press. 2013, p. 463–497. ISBN 978-0-12-386895-4. Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123868954000168>>.
64. ZOU, J. JIANG, H. CHENG, H. FANG, J. and HUANG, G. Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *International Journal of Biological Macromolecules* [interaktyvus]. 2018, Vol. 117, p. 781–789. Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813018318270>>.
65. JUTURU, V. and WU, J.C. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnology Advances* [interaktyvus]. 2018, Vol. 36, no. 8, p. 2187–2200. Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975018301708>>.
66. SALAZAR, F. ORTIZ, A. and SANSINENEA, E. Characterisation of two novel bacteriocin-like substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149 with broad-spectrum antimicrobial activity. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* [interaktyvus]. 2017, Vol. 11, p. 177–182.

- Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716517301558>>.
67. ABRIOUEL, H. FRANZ, C.M.A.P. OMAR, N. Ben and GÁLVEZ, A. Diversity and applications of Bacillus bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews* [interaktyvus]. 2011, Vol. 35, no. 1, p. 201–232. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>>.
68. FIRA, D. DIMKIĆ, I. BERIĆ, T. LOZO, J. and STANKOVIĆ, S. Biological control of plant pathogens by Bacillus species. *Journal of Biotechnology* [interaktyvus]. 2018, Vol. 285, p. 44–55. Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165618305844>>.
69. STEIN, T. Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* [interaktyvus]. 2005, Vol. 56, no. 4, p. 845–857. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>>.
70. RATHORE, A.S. and GUPTA, R.D. Chitinases from Bacteria to Human: Properties, Applications, and Future Perspectives. KUHN, H.Sud. *Enzyme Research* [interaktyvus]. 2015, Vol. 2015, p. 791907. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1155/2015/791907>>.
71. KUMAR, M. BRAR, A. YADAV, M. CHAWADE, A. VIVEKANAND, V. and PAREEK, N. Chitinases—Potential Candidates for Enhanced Plant Resistance towards Fungal Pathogens [interaktyvus]. 2018, Vol. 8, no. 7, p. 88. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.3390/agriculture8070088>>.
72. SABER, W.I.A. GHONEEM, K.M. AL-ASKAR, A.A. RASHAD, Y.M. ALI, A.A. and RASHAD, E.M. Chitinase production by Bacillus subtilis ATCC 11774 and its effect on biocontrol of Rhizoctonia diseases of potato. *Acta Biologica Hungarica Acta Biologica Hungarica* [interaktyvus]. 2015, Vol. 66, no. 4, p. 436–448. Prieiga per internetą: <<https://akjournals.com/view/journals/018/66/4/article-p436.xml>>.
73. WEIKERT, T. NIEHUES, A. CORD-LANDWEHR, S. HELLMANN, M.J. and MOERSCHBACHER, B.M. Reassessment of chitosanase substrate specificities and classification. *Nature Communications* [interaktyvus]. 2017, Vol. 8, no. 1, p. 1698. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01667-1>>.
74. SEO, D.-J. LEE, J.-H. SONG, Y.-S. PARK, R.-D. and JUNG, W.-J. Expression patterns of chitinase and chitosanase produced from Bacillus cereus in suppression of phytopathogen. *Microbial Pathogenesis* [interaktyvus]. 2014. Vol. 73, p. 31–36. Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401014000746>>.
75. SUYOTHA, W. YANO, S. and WAKAYAMA, M.  $\alpha$ -1,3-Glucanase: present situation and prospect of research. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [interaktyvus]. 2016, Vol. 32, no. 2, p. 30. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1007/s11274-015-1977-0>>.
76. LATGÉ, J.-P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology* [interaktyvus]. 2007, Vol. 66, no. 2, p. 279–290. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x>>.
77. PLANAS, A. Bacterial 1,3-1,4- $\beta$ -glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* [interaktyvus]. 2000, Vol. 1543, no. 2, p. 361–382. Prieiga per internetą:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167483800002314>>.

78. HAN, Q. WU, F. WANG, X. QI, H. SHI, L. REN, A. LIU, Q. ZHAO, M. and TANG, C. The bacterial lipopeptide iturins induce *Verticillium dahliae* cell death by affecting fungal signalling pathways and mediate plant defence responses involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity. *Environmental Microbiology* [interaktyvus]. 2015, Vol. 17, no. 4, p. 1166–1188. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12538>>.

79. MILJAKOVIĆ, D. MARINKOVIĆ, J. and BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S. The Significance of *Bacillus spp.* in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops. *Microorganisms*. 2020, Vol. 8, no. 7.

80. PRŠIĆ, J. and ONGENA, M. Elicitors of Plant Immunity Triggered by Beneficial Bacteria [interaktyvus]. 2020, vol. 11. Prieiga per internetą: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.594530>>.

81. GAO, Y.-J. ZHU, H.-J. CHEN, Y. LI, Y.-H. PENG, Y.-F. and CHEN, X.-P. Safety Assessment of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins Cry1C and Cry2A with a Zebrafish Embryotoxicity Test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2018, Vol. 66, no. 17, p. 4336–4344. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01070>>.

82. GLICK, B.R. and GAMALERO, E. Recent Developments in the Study of Plant Microbiomes [interaktyvus]. 2021, vol. 9, no. 7, p. 1533. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.3390/microorganisms9071533>>.

83. Kayembe, C., and Nel, D. Challenges and opportunities for education in the Fourth Industrial Revolution. *African Journal of Public Affairs*. 2019, Vol. 11, no. 3, p. 79–94. Prieiga per internetą: <[https://www.researchgate.net/publication/340579335\\_Challenges\\_and\\_Opportunities\\_for\\_Education\\_in\\_the\\_Fourth\\_Industrial\\_Revolution](https://www.researchgate.net/publication/340579335_Challenges_and_Opportunities_for_Education_in_the_Fourth_Industrial_Revolution)>.

84. SEENIVASAGAN, R. and BABALOLA, O.O. Utilization of Microbial Consortia as Biofertilizers and Biopesticides for the Production of Feasible Agricultural Product [interaktyvus]. 2021, vol. 10, no. 11, p. 1111. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.3390/biology10111111>>.

85. BABALOLA, O.O. KIRBY, B.M. ROES-HILL, M. LE COOK, A.E. CARY, S.C. BURTON, S.G. and COWAN, D.A. Phylogenetic analysis of actinobacterial populations associated with Antarctic Dry Valley mineral soils. *Environmental Microbiology* [interaktyvus]. 2009, Vol. 11, no. 3, p. 566–576. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01809.x>>.

86. POVEDA, J. and GONZÁLEZ-ANDRÉS, F. *Bacillus* as a source of phytohormones for use in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* [interaktyvus]. 2021, Vol. 105, no. 23, p. 8629–8645. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11492-8>>.

87. SOROKAN, A. VESELOVA, S. BENKOVSKAYA, G. and MAKSIMOV, I. Endophytic Strain *Bacillus subtilis* 26D Increases Levels of Phytohormones and Repairs Growth of Potato Plants after Colorado Potato Beetle Damage [interaktyvus]. 2021, vol. 10, no. 5, p. 923. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.3390/plants10050923>>.

88. SHAO, J. LI, Y. LI, Z. XU, Z. XUN, W. ZHANG, N. FENG, H. MIAO, Y. SHEN, Q. and ZHANG, R. Participating mechanism of a major contributing gene *ysnE* for auxin biosynthesis in

- Bacillus amyloliquefaciens SQR9. *Journal of Basic Microbiology* [interaktyvus]. 2021, Vol. 61, no. 6, p. 569–575. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1002/jobm.202100098>>.
89. POVEDA, J. Use of plant-defense hormones against pathogen-diseases of postharvest fresh produce. *Physiological and Molecular Plant Pathology* [interaktyvus]. 2020, Vol. 111, p. 101521. Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0885576520301892>>.
90. ORTIZ, A. and SANSINENEA, E. The Role of Beneficial Microorganisms in Soil Quality and Plant Health [interaktyvus]. 2022, vol. 14, no. 9, p. 5358. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.3390/su14095358>>.
91. MITTER, E.K. TOSI, M. OBREGÓN, D. DUNFIELD, K.E. and GERMIDA, J.J. Rethinking Crop Nutrition in Times of Modern Microbiology: Innovative Biofertilizer Technologies [interaktyvus]. 2021, vol. 5. Prieiga per internetą: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2021.606815>>.
92. SPRAKER, J.E. LUU, G.T. and SANCHEZ, L.M. Imaging mass spectrometry for natural products discovery: a review of ionization methods. *Natural Product Reports* [interaktyvus]. 2020, Vol. 37, no. 2, p. 150–162. Prieiga per internetą: <<http://dx.doi.org/10.1039/C9NP00038K>>.
93. THOMAS, Lebin and Ishwar SINGH. Microbial Biofertilizers: Types and Applications. *Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment*. Delhi, India. 2019. ISBN 978-3-030-18933-4. Prieiga per internetą: <[https://doi.org/10.1007/978-3-030-18933-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-18933-4_1)>.
94. MAÇIK, Mateusz, Agata GRYTA and Magdalena Fraç. Advances in Agronomy: Chapter Two - Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. 2020, Vol. 162, p. 31-87. ISBN 0065-2113. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/bs.agron.2020.02.001>>.
95. MOUSA A. ALLOUZI, M. and et al. Liquid biofertilizers as a sustainable solution for agriculture. 2022, Vol. 8, p. 12. PMID: 36619398. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12609>>.
96. MAHANTY, T. and et al. Environmental Science and Pollution Research. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. 2017, Vol. 24, p. 3315-3335. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1007/s11356-016-8104-0>>.
97. M. EL-GHAMRY, A. and et al. Env. Biodiv. Soil Security: *Nanofertilizers vs. Biofertilizers: New Insights*. 2018, Vol. 2, p. 51-72. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.21608/jenvbs.2018.3880.1029>>.
98. Sizar, O. Leslie, W.S. G. Unakal, C. Gram Positive Bacteria. [žiūrėta 2023-02-19]. *StatPearls* [Interaktyvus]. 2023. Prieiga per internetą: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470553/>>.
99. KARIM, H. L., H. KURNIA, N. and JUNDA, M. Effectivity of Antagonistic Bacteria in Controlling of Fusarium Wilt Diseases of Banana (*Musa paradisiaca*) by in Vitro. *Journal of Physics: Conference Series* [interaktyvus]. 2018, Vol. 1028, no. 1, p. 12014. Prieiga per internetą: <<https://dx.doi.org/10.1088/1742-6596/1028/1/012014>>.
100. SINGER, J. and CYSNER, E. Urease Activity in Mycobacteriaceae. *American Review of*

*Tuberculosis* [interaktyvus]. 1952, Vol. 65, no. 6, p. 779–782. Prieiga per internetą: <<https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/art.1952.65.6.779>>.

101. REINER Karen. Catalase Test Protocol. 2010. Prieiga per internetą: <<https://asm.org/getattachment/72a871fc-ba92-4128-a194-6f1bab5c3ab7/Catalase-Test-Protocol.pdf>>.

102. TAO, J. CHEN, Q. CHEN, S. LU, P. CHEN, Y. JIN, J. LI, J. XU, Y. HE, W. LONG, T. DENG, X. YIN, H. LI, Z. FAN, J. and CAO, P. Metagenomic insight into the microbial degradation of organic compounds in fermented plant leaves. *Environmental Research* [interaktyvus]. 2022, Vol. 214, p. 113902. Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935122012294>>.

103. Starch Hydrolysis Test - Principle, Procedure, Uses and Interpretation. 2022 [žiūrėta 2023-04-01]. Prieiga per internetą: <<https://microbiologyinfo.com/starch-hydrolysis-test/>>.

104. LONE, T.A. REVATHI, C. and LONE, R.A. Isolation of Dye Degrading Bacillus Species from the Soil near Dyeing Industry and Its Potential Application in Dye Effluent Treatment. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*. 2015, vol. 7, no. 3. p. 129-135. Prieiga per internetą: <[https://idosi.org/aejts/7\(3\)15/2.pdf](https://idosi.org/aejts/7(3)15/2.pdf)>.

105. AHAOTU, I. ANYOGU, A. NJOKU, O.H. ODU, N.N. SUTHERLAND, J.P. and OUOBA, L.I.I. Molecular identification and safety of Bacillus species involved in the fermentation of African oil beans (*Pentaclethra macrophylla* Benth) for production of Ugba. *International Journal of Food Microbiology* [interaktyvus]. 2013, Vol. 162, no. 1, p. 95–104. Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160513000081>>.

106. SHARMA, N. MALLICK, S. and SHARMA, D. Amylase producing efficiency of Bacillus species isolated from Jammu soil [interaktyvus]. *Journal of Mycopathological Research*. 2018, Vol. 56, no. 2. p. 123–128. ISSN 0971-3719. Prieiga per internetą: <[https://www.researchgate.net/publication/331072183\\_Amylase\\_producing\\_efficiency\\_of\\_Bacillus\\_species\\_isolated\\_from\\_Jammu\\_soil](https://www.researchgate.net/publication/331072183_Amylase_producing_efficiency_of_Bacillus_species_isolated_from_Jammu_soil)>.

107. NISHA RIJAL. Starch Hydrolysis Test: Principle, Procedure, Results [interaktyvus]. *Biochemical Tests*. 2022. Prieiga per internetą: <<https://microbeonline.com/starch-hydrolysis-test/>>.

108. JINAL, N.H. and AMARESAN, N. Evaluation of biocontrol Bacillus species on plant growth promotion and systemic-induced resistant potential against bacterial and fungal wilt-causing pathogens. *Archives of Microbiology* [interaktyvus]. 2020, Vol. 202, no. 7, p. 1785–1794. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.1007/s00203-020-01891-2>>.

109. NTUSHELO, K. LEDWABA, L.K. RAUWANE, M.E. ADEBO, O.A. and NJOBEH, P.B. The Mode of Action of Bacillus Species against *Fusarium graminearum*, Tools for Investigation, and Future Prospects [interaktyvus]. 2019, vol. 11, no. 10, p. 606. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.3390/toxins11100606>>.

## Publikacijų sąrašas

Publikacijos baigiamojo darbo tema

Pranešimai konferencijų medžiagoje

1. PEČIULIS K., ŽVIRDAUSKIENĖ R. Antagonistic activity of *Bacillus spp.* against phytopathogenic fungi. 15<sup>th</sup> Baltic Conference on Food Science and Technology „Food R&D in the Baltics and Beyond“ FOODBALT 2022 Conference. Kaunas, Lithuania, 2022, 81. e-ISBN 978-609-02-1804-4