

КАЧОР А. І.^{1,2}, ТІСТЕЧОК С. І.¹, ФЕДОРЕНКО В. О.¹, ГРОМИКО О. М.^{1✉}

¹ Львівський національний університет ім. І. Франка,

Україна, 79000, м. Львів, вул. Університетська, 1, ORCID: 0000-0002-3074-2019, 0000-0003-2116-746X, 0000-0002-7672-1897, 0000-0002-8107-0128

² ТОВ «Експлоджен»,

Україна, 79005, м. Львів, вул. Зелена, 20, ORCID: 0000-0002-3074-2019

✉ oleksandr.gromyko@lnu.edu.ua

ФІТОСТИМУЛОВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ АКТИНОМІЦЕТІВ РИЗОСФЕРИ *PHYLLOSTACHYS VIRIDIGLAUCESCENS*

Мета. Актиноміцети є однією з основних груп ризосферних бактерій, які беруть участь у забезпеченні росту та здоров'я рослин. Ці властивості роблять їх перспективними кандидатами для розробки біопрепаратів у рослинництві. Мета роботи полягала у дослідженні фітостимулювальних властивостей актиноміцетів ризосфери *P. viridiglaucescens*. **Методи.** У ході досліджень використано мікробіологічні та статистичні методи. **Результати.** Виявлено 20 % ізолятів, потенційно здатних до синтезу сидерофорів; 12 % – що солюбілізують Фосфор; 26 % – асимілюють атмосферний азот; 55 % – синтезують ауксин-подібні сполуки. Значна частина ізолятів синтезувала АПС у концентрації до 20 мкг/мл. Переважаюча частина ізолятів мала хоча б одну фітостимулювальну властивість. Проте серед актиноміцетів були представники, які поєднували дві і більше властивостей. Штам *Streptomyces* sp. Pv 4-122.1 мав значний позитивний вплив на проростання редиски сорту «Краків'янка», інший штам стрептоміцетів – Pv 4-204 – виявляв потенційну гербіцидну дію. **Висновки.** Значна частина ізолятів має високий потенціал до синтезу фітостимулювальних сполук. Окремі ізоляти можуть бути основою біопрепаратів як для покращення росту рослин, так і з гербіцидною дією.

Ключові слова: бактерії, актиноміцети, *Streptomyces*, фітостимулювальні властивості.

На сьогоднішній день ефективні методи ведення сільського господарства полягають у широкому використанні хімічних добрив, які сприяють захисту та росту рослин. Проте екологічні проблеми, вартість таких добрив та небезпека для здоров'я людини виступає обмежувальним чинником їхнього застосування.

Ризосферні мікроорганізми виступають джерелом природних сполук, які можуть актив-

но застосовуватися не тільки для біозахисту, але і для стимулювання росту рослин. Це дозволяє зменшити використання хімічних добрив та антибіотиків без шкоди для врожаю. Тому вивчення мікробних консорціумів є важливим напрямком у біотехнології, мікробіології та сільському господарстві [2].

Ризосфера – це динамічне середовище, мікробіом якого швидко розвивається у просторі й часі, а рослини здатні формувати мікробне угруповання на власну користь [3]. Одними з ефективних колонізаторів корневих систем рослин є актиноміцети, а їхня здатність утворювати спори забезпечує високий рівень виживання за несприятливих умов навколишнього середовища [9]. Беручи участь у деструкції органічних сполук, зокрема складних природних полімерів, актиноміцети збільшують вміст важливих мікро- і макроелементів, що у свою чергу приводить до покращення родючості ґрунту, сприяє росту та врожайності рослин [1].

Phyllostachys viridiglaucescens (Carrière) Rivière & C. Rivière належить до групи швидко-ростучих трав'янистих рослин і характеризується стійкістю до низьких температур, тому його успішно культивують в Європі та Америці. У Нікітському ботанічному саду (Кримський півострів, Україна) *P. viridiglaucescens* був інтродукований у минулому столітті. Кримський півострів – це унікальна територія, для якої характерний помірний континентальний клімат на півночі та субтропічний середземноморського типу на південному узбережжі. Ризосфера *P. viridiglaucescens* характеризується великою різноманітністю актиноміцетів, серед яких є представники рідкісних родів [7]. У цьому дослідженні ми описуємо фітостимулювальні властивості актиноміцетів ризосфери листокосника сизо-зеленого *P. viridiglaucescens*.

© КАЧОР А. І., ТІСТЕЧОК С. І., ФЕДОРЕНКО В. О., ГРОМИКО О. М.

Матеріали і методи

Зразки ризосферного ґрунту *P. viridiglaucescens* були зібрані у 2008 році. Усього виділено 159 ізолятів актиноміцетів, які зберігаються у Колекції культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків (<https://mccap.org.ua/>).

Для дослідження здатності актиноміцетів синтезувати сидерофори актиноміцети вирощували на середовищі ґЕМ при 28°C протягом 7 днів. На сьому добу росту чашки заливали 2 мл CAS-індикаторним розчином та інкубували при кімнатній температурі 1 годину. Ізоляти, які продукували сидерофори, характеризувалися появою малинового, оранжевого або жовтого ореолу навколо колоній.

Для виявлення здатності до солюбілізації нерозчинних форм Фосфору штами актиноміцетів вирощували на середовищі Муромцева 7 днів при 28°C. Поява прозорих зон навколо ізолятів свідчила про здатність актиноміцетів солюбілізувати Фосфор.

Потенційну здатність актинобактерій до азотфіксації визначали наявністю росту на безазотному середовищі.

Для вивчення рівня синтезу ауксин-подібних сполук (АПС) ізоляти актиноміцетів інокулювали в 10 мл середовища TSB і вирощували на орбітальному шейкері при 180 об/хв і температурі 28°C протягом 2 діб. Одержані прекультури в об'ємі 2 мл висівали у 30 мл середовища SG із додаванням 0,2 % триптофану в 250 мл колбах Ерленмеєра та вирощували за тих самих умов протягом 5 діб. Після відбирали 1 мл культуральної рідини та центрифугували при 12 тис. об./хв протягом 2 хв. До 0,1 мл надосадової рідини додавали рівний об'єм реактиву Сальковського, після чого суміш інкубували протягом 30 хв у темряві при кімнатній температурі. При наявності АПС розчин набував рожевого кольору. В якості контролю використовували суміш з рівним об'ємом реактиву Сальковського з індоліл-3-оцтовою кислотою (ІОК) (концентрація 0,1 %). Кількість АПС визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 530 нм.

Для оцінки фітостимулювального впливу окремих ізолятів актиноміцетів використали насіння редиски сорту «Краків'янка». З цією метою на 8-денні культури актиноміцетів, які культивували на середовищі МС при 28°C, викладали по 10 візуально здорових насінин редиски, після чого чашки інкубували при кімнатній температурі протягом 8 днів. Попередньо насі-

нини витримували 30 хв у 96 % спирті, після чого двічі промивали стерильною дистильованою водою. В якості контролю здійснювали пророщування насінин на середовищі МС без висівання актиноміцетів, а також на МС з газоним штаму *Streptomyces albus* Dell4, в якому делетовані кластери генів вторинного метаболізму. На 8 добу пророщування насінин оцінювали довжину проростків редиски.

Усі дослідження проводили у трьох повторях. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою ANOVA Calculator.

Результати та обговорення

Актиноміцети, які є однією із переважаючих груп бактерій у ризосфері [8], відіграють ключову роль у забезпеченні росту та здоров'я рослин. Їхня здатність до синтезу сидерофорів, солюбілізації фосфору, фіксації атмосферного азоту та синтезу ІОК розширюють функціональність у покращенні росту і врожайності рослин. Ці властивості актиноміцетів відкривають перспективи для вдосконалення агрономічних практик та підвищення стійкості сільськогосподарських культур до несприятливих умов.

Для вивчення потенційних фітостимулювальних властивостей досліджуваних ізолятів визначали їхню здатність продукувати АПК (рис. 1а), сидерофори (рис. 1б), солюбілізувати фосфор із важкорозчинних неорганічних фосфатів (рис. 1в), асимілювати атмосферний азот (рис. 1г). Усього проаналізовано 159 ізолятів актиноміцетів ризосфери *P. viridiglaucescens*. Близько 20 % штамів були здатні продукувати сидерофори, які мають високий афінитет до заліза і каталізують відновлення Fe^{3+} до Fe^{2+} (рис. 1д). Близько 12 % природних ізолятів були здатні солюбілізувати Фосфор. Четверть досліджених ізолятів добре росли на середовищі, що не містило джерел Нітрогену, та вважалися потенційно здатними фіксувати атмосферний азот, перетворюючи його на NH_4^+ . Близько половини ізолятів актиноміцетів із досліджуваного зразка були продуцентами АПС. Подібні результати описані для актиноміцетів, виділених з ризосфери кримських рослин, зокрема для чебрецю почерговоопушеного (*Thymus roegneri* K. Koch.) [6] та сонцещвіту Стевена (*Helianthemum stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd.) [10], хоча для останнього кількість актиноміцетів, що синтезують АПС, була значно меншою.

При кількісному визначенні АПС встановлено, що значна частина ізолятів (61 %) синте-

зують АПС у концентрації до 20 мкг/мл, і тільки 16 % синтезують у кількості 30-40 мкг/мл. При цьому найбільше значення фіксували для ізолята *Streptomyces* sp. Pv 4-204, що становило 40 мкг/мл. Хоча *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Rheinheimera* і *Bacillus* мають вищий рівень синтезу ІОК [12], проте для стрептоміцетів це також характерно [5].

Для 47 % штамів була властива лише одна з потенційних фітостимулювальних властивостей, при цьому половина ізолятів належали до роду *Streptomyces*, решта – до *Micromonospora*, *Nonomuraea*, *Kribbella*, *Actinomadura*, *Arthrobacter* та *Mumia*. Здебільшого йдеться про синтез АПС. 13 % ізолятів мали комбінацію двох властивостей – синтез АПС і азотфіксація або синтез АПС і сидерофорів. Проте серед штамів актиноміцетів були представники, які поєднували й інші властивості. Наприклад, для *Cellulosimicrobium* sp. Pv 4-284 ми виявили зда-

тність до синтезу АПС та солюбілізації фосфору, а *Streptomyces* sp. Pv 4-42 та Pv 4-220 характеризувалися синтезом сидерофорів та азотфіксацією. Також ми виявили ізоляти *Streptomyces* sp. Pv 4-204 та Pv 4-209, яким були властиві усі досліджені фітостимулювальні властивості.

Спираючись на отримані дані, ми дослідили вплив окремих ізолятів на проростання насіння редиски сорту «Краків'янка». Основним критерієм для вибору штамів була потенційна здатність до синтезу АПС. Це пов'язано з тим, що ці сполуки, зокрема ІОК, мають властивість прискорювати проростання насіння шляхом регуляції ендогенних гормонів та метаболізму сахарози [11]. Також ми врахували й інші фітостимулювальні властивості. Для експерименту було обрано чотири ізоляти (табл.). Ці штами характеризуються швидким ростом і нагромадженням біомаси, що є важливим критерієм для створення біопрепаратів.

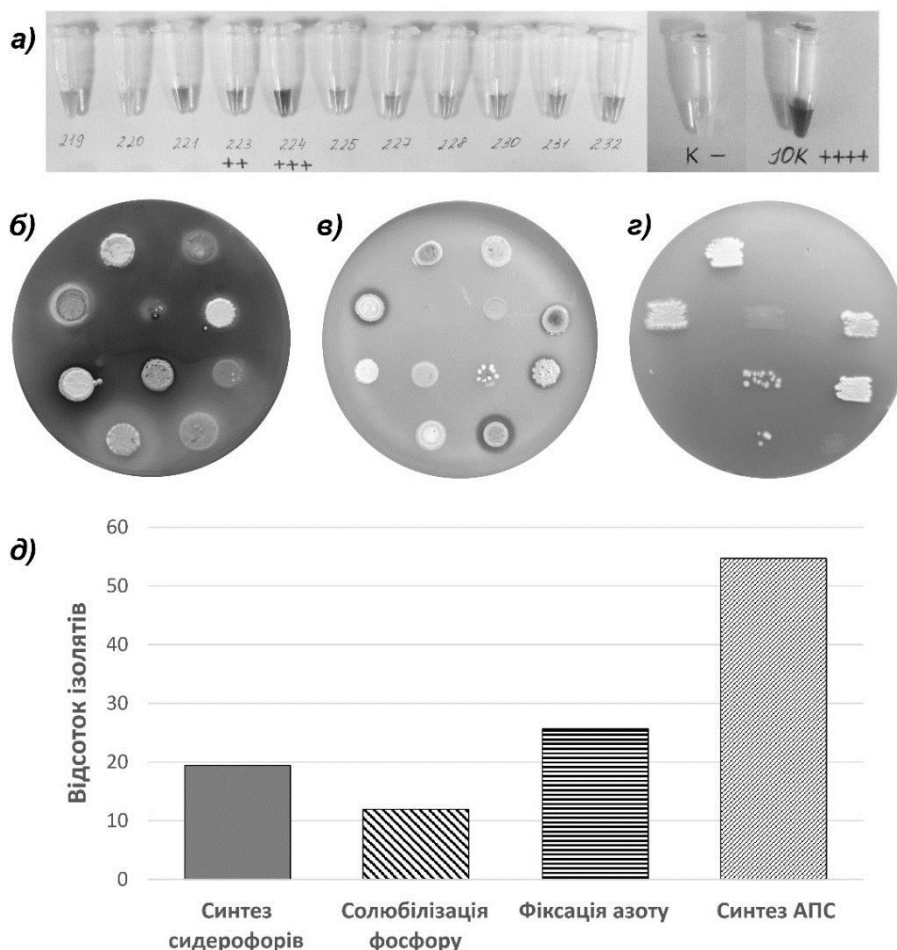


Рис. 1. Здатність актиноміцетів ризосфери *P. viridiglaucescens* продукувати фітостимулювальні молекули: синтез АПС (а) та сидерофорів (б), солюбілізація Фосфору (в), потенційна здатність до фіксації Нітрогену (г). Загальна кількість штамів актиноміцетів із фітостимулювальними властивостями (д).

Таблиця. Характеристика окремих ізолятів актиноміцетів ризосфери *P. viridiglaucescens*

Ізолят	Рід	Синтез сидерофорів	Солубілізація Фосфору	Концентрація АПК, мкг/мл	Здатність до азотфіксації
Pv 4-31	<i>Streptomyces</i>	+	+	0	+
Pv 4-122.1	<i>Streptomyces</i>	-	+	16	+
Pv 4-204	<i>Streptomyces</i>	+	+	40	-
Pv 4-209	<i>Streptomyces</i>	+	+	33	+

У якості контролю насінини пророщували на середовищі без актиноміцетів, а також на газоні штаму *S. albus* Del14, у якому делетовані кластери генів вторинного метаболізму і який не синтезує ІОК. На 8 добу пророщування насіння на культурах актиноміцетів фіксували довжину проростків та порівнювали з контрольними групами (рис. 2).

Досліджувані штами мали різний вплив на проростання насінин редиски. У присутності ізоляту Pv 4-31, який не продукував АПС, та Pv 4-209, що синтезував АПС у концентрації 33 мкг/мл, довжина проростків значно не відрізнялася від контрольних зразків.

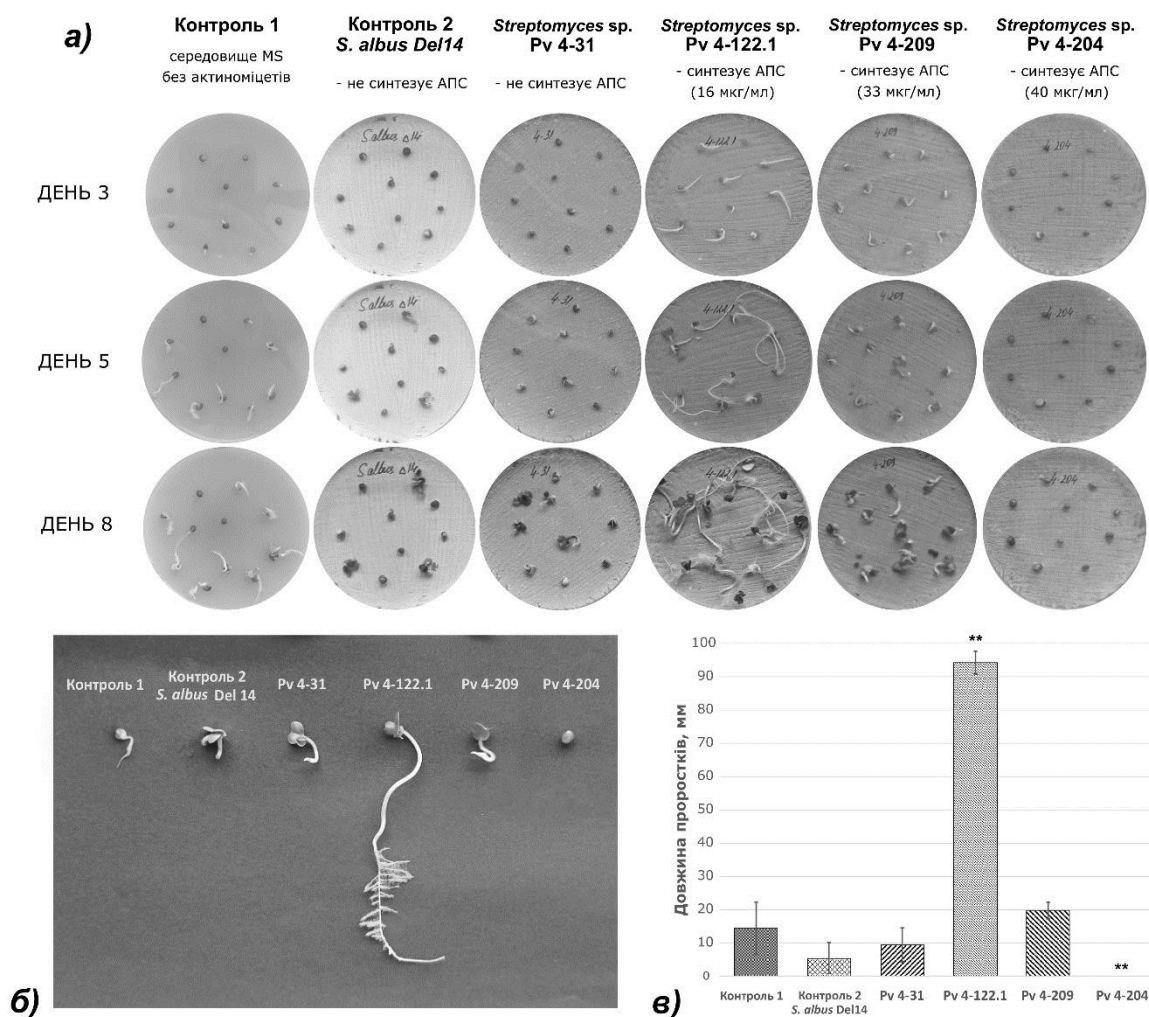


Рис. 2. Вплив ізолятів актиноміцетів на проростання насінин редиски. (а) Динаміка проростання. (б) Пророщене насіння редиски (8 доба росту) в присутності актиноміцетів. (в) Середня довжина проростків редиски на восьму добу росту (** – $p < 0,01$ порівняно з Контролем 1 та Контролем 2).

Штам Pv 4-122.1, який продукує 16 мкг/мл АПС, позитивно впливав на проростання насінин та ріст проростків. Довжина проростків редиски була значно більшою порівняно з контрольними групами та становила $94,2 \pm 3,5$ мм, що перевищує довжину проростків контрольних зразків у 7 разів (рис. 2в). При цьому корені мали розвинені кореневі волоски. Протилежний результат спостерігали на газоні штаму Pv 4-204, який синтезував АПС у концентрації 40 мкг/мл. У присутності ізоляту насінини редиски не проростали у жодному з трьох повторів (рис. 2а, б).

Вплив різних концентрацій АПС, зокрема ІОК, має різний ефект на проростання насінин. Результати, представлені у цій роботі, узгоджуються із відомостями, наведеними в літературі [4, 11]. Наприклад, обробка насінин бавовнику *Gossypium hirsutum* L. ІОК у концентрації 20 мкг/мл сприяла інтенсивному проростанню насінин і росту коренів та пагонів [11]. Подібний результат ми отримали за використання ізоляту Pv 4-122.1. ІОК у концентрації вище 40 мкг/мл може чинити інгібувальний ефект на проростання насінин *Cyperus rotundus* L. [4]. Тому ми припускаємо, що відсутність проростання насінин редиски на газоні штаму Pv 4-204 може бути пов'язана з підвищеним рівнем продукції

ІОК. Проте не виключено, що такий ефект може бути спричинений синтезом антибіотичних сполук. Подальший хімічний аналіз вторинних метаболітів штаму Pv 4-204 дозволить прояснити це питання.

Отримані результати вказують на те, що ізоляти Pv 4-122.1 та Pv 4-204 можуть бути основою для біопрепаратів і використані з різною метою.

Висновки

У результаті дослідження актиноміцетів ризосфери *P. viridiglaucescens* встановлено, що значна частина ізолятів має високий потенціал до синтезу сполук, залучених до стимулювання росту і розвитку рослин. Досліджені ізоляти мали різний вплив на проростання насінин редиски. Штам *Streptomyces* sp. Pv 4-122.1 мав значний позитивний вплив на проростання насінин редиски та може бути використаний для створення біопрепарату для підвищення врожайності та стійкості рослин до несприятливих умов. У той же час для ізоляту Pv 4-204 виявлено гербіцидну дію. Подальше дослідження взаємодії між цими бактеріями та рослинами може визначити оптимальні умови для їхнього застосування у сільському господарстві та органічному землеробстві.

References

1. AbdElgawad H., Abuelsoud W., Madany M. M., Selim S., Zinta G., Mousa A. S., et al. Actinomycetes enrich soil rhizosphere and improve seed quality as well as productivity of legumes by boosting nitrogen availability and metabolism. *Biomolecules*. 2020. Vol. 10. 1675 p. doi: 10.3390/biom10121675.
2. Ahmad F., Ahmad A. I., Khan M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* 2008. Vol. 163. P. 173–181. doi: 10.1016/j.micres.2006.04.001.
3. Bakker P. A., Berendsen R. L., Doornbos R. F., Wintermans P. C., Pieterse C. M. The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Front. Plant Sci.* 2013. Vol. 4. 165 p. doi: 10.3389/fpls.2013.00165.
4. Bunsangiam S., Thongpae N., Limtong S. et al. Large scale production of indole-3-acetic acid and evaluation of the inhibitory effect of indole-3-acetic acid on weed growth. *Sci. Rep.* 2021. Vol. 11. 13094. doi: 10.1038/s41598-021-92305-w.
5. Goudjal Y., Toumatia, O., Sabaou N., Barakate M., Mathieu F., Zitouni A. Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: indole-3-acetic acid production and tomato plants growth promoting activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2013. Vol. 29 (10). P. 1821–1829. doi: 10.1007/s11274-013-1344-y.
6. Gromyko O. M., Tistechok S. I., Chornobai V. I., Fedorenko V. O. Antagonistic and plant growth promoting activities of rhizospheric actinomycetes from *Thymus roegneri* K. Koch. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2017. Vol. 20. P. 129–133. doi: 10.7124/FEEO.v20.749. [in Ukrainian]
7. Kachor A., Tistechok S., Rebets Y., Fedorenko V., Gromyko O. Bacterial community and culturable actinomycetes of *Phyllostachys viridiglaucescens* rhizosphere. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2024. Vol. 117 (1). doi: 10.1007/s10482-023-01906-0.
8. Ling N., Wang T., Kuzyakov Y. Rhizosphere bacteriome structure and functions. *Nat. Commun.* 2022. Vol. 13 (1). 836. doi: 10.1038/s41467-022-28448-9.
9. Santos-Medellin C., Edwards J., Liechty Z., Nguyen B., Sundaresan V. Drought stress results in a compartment-specific restructuring of the rice root-associated microbiomes. *MBio*. 2017. Vol. 8. e00764-e00717. doi: 10.1128/mBio.00764-17.
10. Tistechok S., Mytsyk Y., Fedorenko V., Gromyko O. Biosynthetic potential of actinomycetes from *Helianthemum stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. rhizosphere. *Innov Biosyst Bioeng.* 2019. Vol. 3 (2). P. 105–113. doi: 10.20535/ibb.2019.3.2.170129. [in Ukrainian]
11. Zhao T., Deng X., Xiao Q., Han Y., Zhu S., Chen J. IAA priming improves the germination and seedling growth in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via regulating the endogenous phytohormones and enhancing the sucrose metabolism. *Ind. Crops. Prod.* 2020. Vol. 155. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112788.

12. Zhang B. X., Li P. S., Wang Y. Y., Wang J. J., Liu X. L., Wang X. Y., Hu X. M. Characterization and synthesis of indole-3-acetic acid in plant growth promoting *Enterobacter* sp. *RSC Adv.* 2021. Vol. 11 (50). P. 31601–31607. doi: 10.1039/d1ra05659j.

KACHOR A.I.^{1,2}, TISTECHOK S.I.¹, FEDORENKO V. O.¹, GROMYKO O. M.¹

¹ *Ivan Franko National University of Lviv,
Ukraine, 79005, Lviv, Universytetska str., 1*

² *Explogen LLC,
Ukraine, 79005, Lviv, Zelena str., 20*

EXPLORING PLANT GROWTH PROMOTION BY ACTINOMYCETES FROM *PHYLLOSTACHYS VIRIDIGLAUCESCENS* RHIZOSPHERE

Aim. Actinomycetes are one of the main groups of rhizospheric bacteria involved in plant growth and health enhancement. This makes them promising candidates for the development of biopreparations in agriculture. The aim of this study was to explore the plant growth promoting actinobacteria isolated from *P. viridiglaucescens* rhizosphere.

Methods. Standard microbiological and statistical methods were used. **Results.** 20 % of the isolates were found to be potentially capable of siderophore synthesis; 12 % – solubilized inorganic phosphorus; 26 % – assimilated atmospheric nitrogen; and 55 % – produced auxin-related substances. A significant part of the isolates produced auxin-related substances at a concentration of up to 20 µg/ml. The majority of isolates had at least one plant growth promoting property. However, among the actinomycetes, there were representatives that combined two or more properties. The strain *Streptomyces* sp. Pv 4-122.1 had a significant positive impact on the radish germination of the “Krakivianka” variety, while another actinomycete strain – Pv 4-204 – exhibited potential herbicidal activity. **Conclusions.** A significant part of the isolates has a high potential for the production of plant growth promoting compounds. Individual isolates can serve as the basis for biopreparations both to enhance plant growth and with herbicidal effects.

Keywords: bacteria, actinomycetes, *Streptomyces*, plant growth promoting properties.