

О. Д. Масловська, С. Я. Комплікевич, В. Г. Буняк,
О. М. Мороз, С. О. Гнатуш

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, м. Львів, 79005, Україна,
e-mail: svitlana.hnatush@lnu.edu.ua

ФІТОСТИМУЛЮВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ МЕТАЛОРЕЗИСТЕНТНИХ БАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ З РИЗОСФЕРИ *COLOBANTHUS QUITENSIS* (KUNTH) BARTL. (О. ДЕСЕПШН, МОРСЬКА АНТАРКТИКА)

Враховуючи зміни клімату, забруднення ґрунтів внаслідок діяльності людини, зокрема військових дій, виділення стійких до чинників середовища мікроорганізмів з фітостимулювальними властивостями є актуальним. Середовища з екстремальними умовами є джерелом для виділення мікроорганізмів, які можуть мати перспективу використання в біотехнології. **Мета роботи:** дослідити здатність металорезистентних галотолерантних ізолятів бактерій, виділених із зони ризосфери *C. quitensis* (Kunth) Bartl. (о. Десепшн, Морська Антарктика), синтезувати сидерофори й ауксиноподібні сполуки, фіксувати молекулярний азот, солюбілізувати сполуки цинку, синтезувати деякі ферменти та стимулювати ріст ярої пшениці *Triticum aestivum* сорту *Tybal*, а також відібрати перспективні штами для ідентифікації та включення до складу мікробних препаратів. **Матеріали і методи.** Виділення ізолятів бактерій та дослідження їхніх властивостей проводили класичними мікробіологічними методами. Здатність продукувати сидерофори виявляли з використанням хромазуролу *S* і гексадецилтриметиламоній броміду, ауксиноподібні сполуки – з реактивом Сальковського. Насіння пшениці інокулювали суспензіями бактерій та висівали у ґрунт. Досліджували схожість насіння, вологість, суху масу, вміст пігментів у листках, морфометричні показники проростків. **Результати.** Шість з 19 відібраних галотолерантних металорезистентних ізолятів бактерій, які утворювали сидерофори, ауксиноподібні сполуки та за наявності ензиматичної активності (D388 і D391 – амілазної, D389 і D394 – протеазної, D390 – ліпазної, D395 – протеазної, амілазної, ліпазної, лецитиназної, целюлазної) відібрали для дослідження впливу на ріст пшениці. Загальний вміст хлорофілу був найбільшим у листках пшениці, обробленої ізолятами D389 і D388. Вміст хлорофілу а у листках пшениці, обробленої ізолятами D389, D395 і D388 був на 13,4–28,7% вищим, порівняно з контролем. Найвищий вміст сидерофорів виявлено у середовищі культивування ізоляту D388 ($10,94 \pm 1,2$ ум. од.), ауксиноподібних сполук ($10,93 \pm 1,0$ мкг/мл) – ізоляту D387. **Висновки.** Металорезистентні галотолерантні ізоляти бактерій із ризосфери *C. quitensis* виявляють фітостимулювальний вплив на ріст пшениці. За здатністю синтезувати сидерофори, ауксиноподібні сполуки, фіксувати N_2 , солюбілізувати ZnO , стимулю-



вати ріст *T. aestivum*, наявністю амілазної активності для ідентифікації та перевірки у складі бактерійного препарату відібрали ізолят D388.

Ключові слова: антарктичні мікроорганізми, фітостимулювальні бактерії, сидерофори, ауксиноподібні сполуки, металорезистентні мікроорганізми.

Ризосфера – зона ґрунту в межах кількох міліметрів, що оточує коріння рослин. Її характеризує підвищена біологічна активність завдяки впливу різних сполук, які виділяють коренева система рослини та мікробіота. Мікроорганізми ризосфери впливають на життєдіяльність рослин. Серед них є як патогенні, так і фітостимулювальні. У ризосфері *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. переважають представники *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidota*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia* і *Actinobacteria* [22].

Використання препаратів на основі мікроорганізмів з фітостимулювальними властивостями є сучасним підходом до покращення родючості ґрунту, захисту рослин від фітопатогенів та несприятливих чинників середовища [11]. Механізм позитивної дії фітостимулювальних мікроорганізмів пов'язаний із їхньою здатністю фіксувати азот, розчиняти сполуки феруму, фосфору, цинку, калію та інших елементів, продукувати фітогормони, пригнічувати розвиток фітопатогенів і синтезувати речовини, що підвищують стійкість рослин до стресів, спричинених абіотичними чинниками [13, 20]. Деякі фітостимулювальні мікроорганізми, окрім безпосереднього впливу на рослину, також забезпечують розщеплення пестицидів і детоксикацію сполук важких металів [21]. Враховуючи глобальні зміни клімату, забруднення посівних площ різноманітними поллютантами унаслідок антропогенної діяльності і військових дій, актуальною є потреба виділення стійких до чинників середовища фітостимулювальних мікроорганізмів. Середовища з несприятливим умовами існування часто є джерелом для виділення біотехнологічно перспективних штамів мікроорганізмів. Тому метою роботи було дослідити здатність металорезистентних галотолерантних ізолятів бактерій, виділених із зони ризосфери *C. quitensis* (Kunth) Bartl. (о. Десепшн, Морська Антарктика), синтезувати сидерофори й ауксиноподібні сполуки, фіксувати молекулярний азот, солюбілізувати сполуки цинку, синтезувати деякі ферменти та стимулювати ріст ярої пшениці *Triticum aestivum* сорту Tybalt, а також відібрати перспективні штами для ідентифікації та включення до складу мікробних препаратів.

Матеріали і методи

У роботі використовували зразки ґрунту з зони ризосфери *C. quitensis* (о. Десепшн, Морська Антарктика, -62.982130, -60.518980). Для виділення мікроорганізмів до 1 г ґрунту із зони ризосфери *C. quitensis* додавали 9 мл 0,9% розчину натрій хлориду. Ретельно перемішавши, отриману суспензію витримували 20 хв, після чого її знову струшували та робили розведення і висівали 0,1 мл на середовища: триптон-соєвий агар (ТСА) (Merck, Millipore) для виділення мікроорганізмів, які метаболізують нітроген органічних сполук; ТСА, розведений у 10 разів, для виділення оліготрофних мікроорганізмів; крохмально-аміачне середовище – для мікроорганізмів, які метаболізують ні-



тропоген неорганічних сполук; середовище Ешбі для олігонітрофільних, у т. ч. азотофіксувальних бактерій; середовище Сабура (Merck, Millipore) – для мікроскопічних грибів; середовища Виноградського – для мікроорганізмів, які забезпечують першу і другу фази нітрифікації; середовище Піковської – для мікроорганізмів, які здатні солюбілізувати неорганічні фосфоровмісні сполуки; середовище Менкіної – для мікроорганізмів, які метаболізують органічні фосфатовмісні сполуки [2, 16, 17]. Мікроорганізми вирощували 5–10 діб за аеробних умов та температури $+20\pm 2$ °C.

Чисті культури отримували після кількаразових пересівів на розведене у 10 разів ТСА методом збідненого штриха. Чистоту культури перевіряли візуально за морфологією колоній, формою клітин та їхніми розмірами (мікроскоп KRUSS A. MBL2000).

Для визначення стійкості мікроорганізмів до сполук важких металів використовували розведений у 10 разів ТСА, до якого додавали різні концентрації манган(II) хлориду тетрагідрату (1,0; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0 мМ), ферум(II) сульфату гептагідрату (0,5; 2,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0 мМ), кобальт(II) хлориду гексагідрату (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мМ), кадмій хлориду геміпентагідрату (0,0002; 0,01; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 мМ), купрум(II) хлориду дигідрату (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 мМ), калій дихромату (0,1; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,5; 10,0 мМ). Для визначення стійкості мікроорганізмів до NaCl використовували розведений у 10 разів ТСА, до якого додали натрій хлорид у різних концентраціях (2,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0%). Середовища стерилізували за 121 °C упродовж 20 хв, після чого здійснювали посів культур. Бактерії вирощували впродовж трьох-п'яти діб за 20 ± 2 °C.

Для виявлення здатності мікроорганізмів синтезувати сидерофори використовували середовище із хромазулолом S і гексадецилтриметиламоній бромідом [15]. Ізоляти висівали штрихом і вирощували за температури $+20\pm 2$ °C упродовж 5–10 діб. Здатність синтезувати сидерофори оцінювали за утворенням жовтої (сидерофори α -гідроксикарбоксилатного типу) чи рожевої (органічні кислоти) зони навколо штрихів досліджуваних ізолятів [18]. Деякі Грам-позитивні бактерії є чутливими до гексадецилтриметиламоній броміду, тому ми використовували модифіковану методику визначення здатності синтезувати сидерофори. Бактерії вирощували на середовищі MM9, а тоді штрихи заливали розчином барвників у 0,9% розчині агарози. Спостерігали за утворенням жовтого або рожевого забарвлення навколо штрихів ізолятів, залежно від типу сидерофорів [19]. Для кількісного визначення вмісту сидерофорів використовували метод, описаний у роботі [8].

Для дослідження здатності бактерій синтезувати ауксиноподібні сполуки, їх вирощували впродовж трьох діб за температури 20 ± 2 °C у живильному бульйоні з 0,15 г триптофану на 1 л середовища [12]. Вміст ауксиноподібних сполук визначали, використовуючи модифіковану методику з додаванням реактиву Сальковського, та обраховували за калібрувальною кривою. Для побудови кривої використовували розчин індолілоцтової кислоти (1–30 мкг/мл).

Для визначення здатності бактерій фіксувати N_2 їх інкубували у рідкому середовищі Ешбі впродовж семи діб за температури 20 ± 2 °C. Поява помутніння в середовищі була ознакою здатності бактерій до фіксації азоту з повітря [2].



Для виявлення целюлазної активності бактерії вирощували на середовищі із карбоксиметилцелюлозою сім діб. Для визначення здатності бактерій гідролізувати целюлозу середовище заливали розчином Люголя. У разі розщеплення карбоксиметилцелюлози навколо колоній бактерій утворювалися прозорі зони. Індекс ензиматичної активності (IE) визначали за формулою: $IE = (A-B) / B$, де: A – діаметр зони гідролізу целюлози, мм; B – діаметр колонії бактерій, мм [7].

Для визначення здатності бактерій солюбілізувати ZnO їх вирощували на середовищі такого складу (г/л): глюкоза – 10,0; амоній сульфат – 1,0; калій хлорид – 0,2; дикалій гідрофосфат – 0,1; магнію сульфату гептагідрат – 0,2; агар – 20,0; дистильована вода – 1,0 л. ZnO (0,1%), стерилізували окремо [9]. У разі здатності штаму солюбілізувати ZnO навколо колоній після семи діб вирощування утворювалися прозорі зони. Індекс солюбілізації (IS) визначали за формулою: $IS = (A-B) / B$, де: A – діаметр зони солюбілізації ZnO, мм; B – діаметр колонії бактерій, мм [10].

Для виявлення ліпазної активності мікроорганізми вирощували упродовж п'яти діб на середовищі такого складу (г/л): пептон – 10,0; натрій хлорид – 5,0; кальцій хлорид гексагідрат – 0,1; агар – 20,0; вода дистильована – 1,0 л, pH 7,2–7,4. Після стерилізації до середовища вносили водний розчин твіну-20 (поліоксіетилен-20-сорбітанмонолаурат) у концентрації 10 г/л. За наявності ліпаз навколо штрихів досліджуваних мікроорганізмів утворювалася непрозора зона кальцієвих солей жирних кислот, які вивільнялися із твіну-20 [2].

Протеолітичну активність досліджуваних бактерій оцінювали за їхньою здатністю розріджувати желатин після посіву суспензії досліджуваного штаму бактерій уколом у стовпчик триптон-соевого бульйону (Merck, Millipore) з желатином (12,5%). Бактерії культивували за температури 20 ± 2 °C сім-десять діб. Розрідження желатину або відсутність цієї ознаки оцінювали візуально, реєструючи інтенсивність та форму розрідження [2].

Для виявлення лецитиназної активності бактерії впродовж п'яти діб культивували на середовищі Менкіної такого складу (г/л): глюкоза – 10,0; амоній сульфат – 0,5; магнію сульфату гептагідрат – 0,3; калій хлорид – 0,3; манган сульфат – 0,001; ферум сульфат – 0,001; кальцій карбонат – 5,0; соєвий лецитин – 3,5; агар – 20,0; дистильована вода; pH 7,0–7,2. Утворення прозорої зони навколо колоній бактерій свідчило про їхню лецитиназну активність [16].

Для виявлення здатності досліджуваних бактерій синтезувати амілази, використовували метод посіву газonom на агаризоване живильне середовище, яке містить 1–2% крохмалю. Ріст оцінювали візуально після семи діб вирощування. Для визначення ступеня гідролізу крохмалю амілазами культури мікроорганізмів її колонії заливали розчином Люголя. Середовище з крохмалем забарвлювалося в синій колір, а зони, де відбулося розщеплення крохмалю, залишалися світлими, або забарвлювалися в червоно-бурий колір (реакція на декстрини). Визначали індекс амілазної активності (IA) за формулою: $IA = (A-B) / B$, де: A – діаметр зони гідролізу крохмалю, мм; B – діаметр колонії бактерій, мм [14].



Для дослідження впливу мікроорганізмів на показники проростання пшениці, насіння замочували на ніч у суспензії бактерій густиною 5,0 за Мак-Фарландом, після чого висівали у вологий ґрунт (маса ґрунту для кожної проби 450 ± 20 г). Для приготування суспензії використовували 0,9% натрій хлорид і культуру бактерій із стаціонарної фази росту, вирощену на ТСА (розведення у 10 разів). Для легшого підрахунку насіння поміщали у товщу ґрунту рядками та скроплювали водою. Щоденно у ґрунт вносили 50 мл води з водогону. Пшеницю вирощували впродовж чотирнадцяти діб, після чого проводили визначення вмісту пігментів і сухої маси рослини ваговим методом [5]. Схожість насіння пшениці визначали впродовж восьми діб росту [3]. Для кількісного визначення пігментів наважку свіжого рослинного матеріалу (0,3–0,5 г) розтирали у фарфоровій ступці з невеликою кількістю крейди у 96% розчині етанолу (2–3 мл). Після настоювання упродовж двох–трьох хвилин екстракт фільтрували. Екстракцію пігментів продовжували невеликими порціями чистого розчинника на фільтрі аж до повного виділення пігментів. Екстракти кількісно переносили в мірну колбу на 25 мл і об'єм витягу доводили до мітки 96% розчином етанолу. Для кількісного визначення пігментів частину отриманого екстракту наливали у кювету спектрофотометра (UV/Vis P3 серія Precision, оптичний шлях 10 мм). Іншу кювету заповнювали 96% розчином етанолу (контроль). Визначали оптичну густину витягу. Максимум поглинання для хлорофілу *a* спостерігали за довжини хвилі 665 нм, а для хлорофілу *b* – 649 нм. Концентрації пігментів розраховували за формулами: $C_a = 13,70 \cdot D_{665} - 5,76 \cdot D_{649}$ (мкг/мл); $C_b = 25,80 \cdot D_{649} - 7,60 \cdot D_{665}$ (мкг/мл); $C_{a+b} = 6,10 \cdot D_{665} + 20,04 \cdot D_{649}$ (мкг/мл). Після встановлення вмісту пігментів у витягу, визначали його вміст у дослідному матеріалі за формулою: $A = C \times V / P \times 1000$, де *A* – вміст пігменту в рослинному матеріалі, мкг/г маси сирової речовини; *C* – концентрація пігментів, мкг/мл; *V* – об'єм витягу пігментів, мл; *P* – наважка рослинного матеріалу, г [5].

Статистичні розрахунки результатів досліджень проводили з використанням програм “Microsoft Excel 2016”, а побудову графіків – із OriginPro 8.5. Результати представлені як середнє значення з поправкою на стандартне відхилення ($\bar{x} \pm SD$). Достовірність даних і різниці між ними оцінювали за коефіцієнтом Стюдента. Достовірною вважали різницю за рівня значимості $p \leq 0,05$ [4].

Результати та їх обговорення

Мікроорганізми, які метаболізують нітроген органічних сполук ($1,03 \times 10^9 \pm 5,16 \times 10^7$ КУО/г сухого ґрунту), є найчисельнішою групою мікроорганізмів зони ризосфери *C. quitensis*. Чисельність оліготрофних мікроорганізмів була в 5,3 раза нижчою, порівняно з ними. Менш чисельними були мікроорганізми, які метаболізують неорганічні сполуки нітрогену, неорганічні фосфатовмісні сполуки, олігонітрофільні, у т. ч. азотофіксуювальні мікроорганізми, нітрифікуювальні мікроорганізми, мікроскопічні гриби. Їхня чисельність була від $4,2 \times 10^7$ до $8,2 \times 10^7$ КУО/г сухого ґрунту. Хімічний склад ґрунту, ймовірно, зумовлює переважання серед мікроорганізмів тих, які здатні окиснювати NO_2^- , порівняно з чисельністю мікроорганізмів, які окиснюють NH_4^+ (рис. 1).



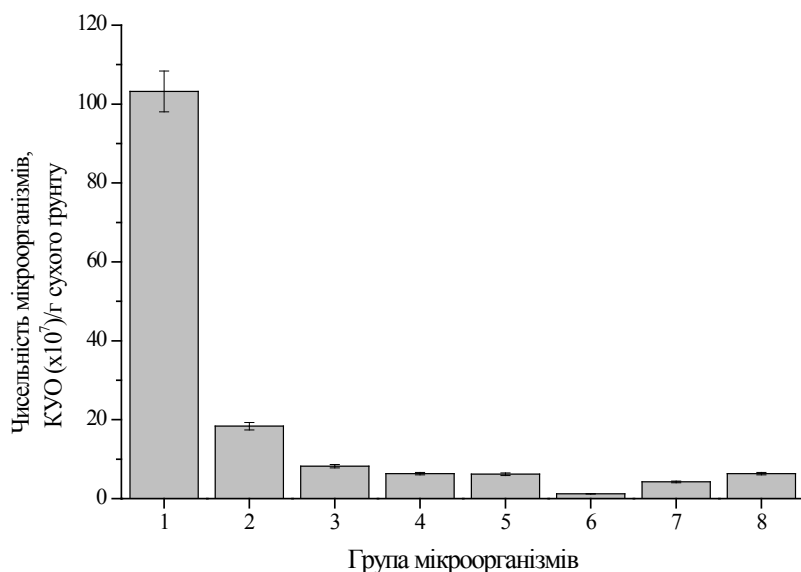


Рис. 1. Чисельність груп мікроорганізмів зони ризосфери *Colobanthus quitensis*:
 1 – мікроорганізми, які метаболізують нітроген органічних сполук; 2 – оліготрофні мікроорганізми; 3 – мікроорганізми, які метаболізують неорганічні нітрогеновмісні сполуки; 4 – олігонітрофільні мікроорганізми; 5 – мікроорганізми, які здійснюють першу фазу нітрифікації; 6 – мікроорганізми, які здійснюють другу фазу нітрифікації; 7 – мікроорганізми, які метаболізують неорганічні фосфатовмісні сполуки; 8 – мікроскопічні гриби

Fig. 1. Numbers of microorganisms of different groups in the rhizosphere zone of *Colobanthus quitensis*:

1 – microorganisms that metabolise nitrogen from organic compounds; 2 – oligotrophic microorganisms; 3 – microorganisms that metabolise inorganic nitrogen-containing compounds; 4 – oligotrophic microorganisms; 5 – microorganisms that carry out the first phase of nitrification; 6 – microorganisms that carry out the second phase of nitrification; 7 – microorganisms that metabolise inorganic phosphate-containing compounds; 8 – microscopic fungi

Жодна колонія, яка виросла на середовищі Менкіної, не утворювала зони розщеплення лецитину. Це дозволяє стверджувати, що мікроорганізмів, які метаболізують органічні фосфатовмісні сполуки, у зразку не було.

У результаті первинного скринінгу дев'ятнадцять ізолятів мікроорганізмів, які відрізнялися за морфологією колоній за росту на середовищах Піковської, Ешбі та середовищі з карбоксиметилцелюлозою, були виділені у чисті культури. Клітини вісімнадцяти ізолятів забарвлювалися негативно за методом Грама і були паличкоподібними бактеріями. Один ізолят (D388) слабо забарвлювався за Грамом. У мазку його клітини розташовані попарно і формували V- або Y-подібні скупчення.

У різних біотопах Антарктиди фіксують високі концентрації сполук важких металів та інших забруднювачів, хоча вона є географічно ізольованим континентом та не зазнає значного впливу діяльності людей [9]. Серед дев'ятнадцяти досліджених ізолятів з ризосфери *C. quitensis* сімнадцять ізолятів стійкі до впливу калій біхромату (0,5 мМ), п'ять – до впливу купруму(II) хлориду дигідрату (6,0 мМ), три – до впливу манган(II) хлориду тетрагідрату (20,0 мМ), два – до впливу ферум(II) сульфату гептагідрату (20 мМ), два – до

впливу кадмій хлориду дигемідрату (0,1 мМ), один – до впливу кобальт(II) хлориду гексагідрату (5,0 мМ) [1].

Однією з головних причин деградації ґрунтів сільськогосподарського призначення є їхнє засолення. Це зумовлено як природними процесами, так і діяльністю людини. Надмірна солоність середовища спричиняє осмотичний стрес та негативно впливає на ріст рослин. Рослини здатні накопичувати осмоліти і підтримувати низький рівень Na^+ всередині клітин для зменшення впливу високої концентрації солі. Симбіоз з мікробіомом ризосфери також є одним із механізмів стійкості рослин до осмотичного стресу [6]. Серед виділених із ризосфери *C. quitensis* ізолятів бактерій тринадцять були помірними галофілами, які здатні рости за наявності в середовищі 2,5% натрій хлориду, шість – були здатні рости за наявності в середовищі 7,5% натрій хлориду. Ізоляти D386, D387, D388 і D391 росли на середовищі з 10,0% натрій хлориду. Ізолят D391 був екстремальним галофілом, який ріс за впливу 15,0% натрій хлориду [1].

Ізоляти D388, D389, D390 та D384 з ризосфери *C. quitensis* були здатні синтезувати сидерофори, ймовірно, α -гідроксикарбоксилатного типу, оскільки середовище навколо штрихів забарвлювалося у жовтий колір. Найвищий вміст сидерофорів виявлено у середовищі культивування ізолятів бактерій D388 ($10,94 \pm 1,2$ ум. од.) та D389 ($5,6 \pm 0,5$ ум. од.), а найнижчий – у середовищі культивування D384 ($0,26 \pm 0,02$ ум. од.) (рис. 2).

Усі відібрані з зони ризосфери *C. quitensis* ізоляти бактерій утворювали ауксиноподібні сполуки. Їх найвищий вміст ($10,93 \pm 1,0$ мкг/мл, $8,24 \pm 0,8$ мкг/

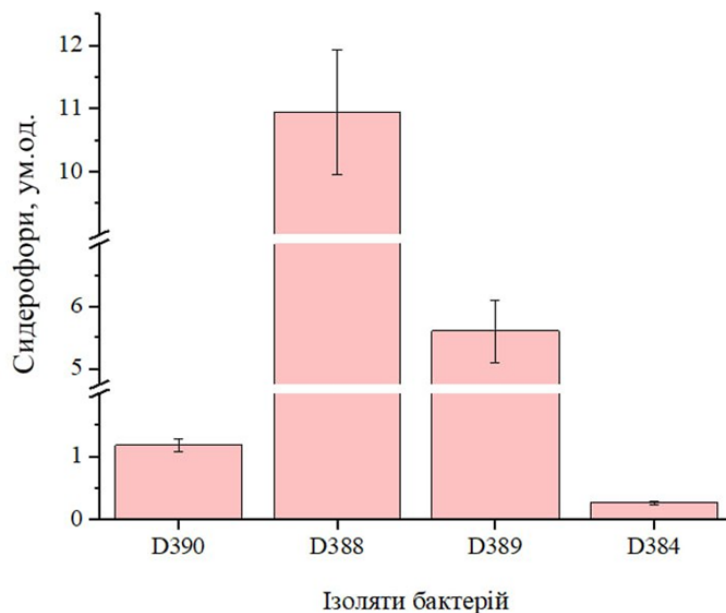


Рис. 2. Вміст сидерофорів у середовищі культивування бактерій з ризосфери *Colobanthus quitensis* ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 3$)

Fig. 2. Siderophore concentration measurement in the culture medium of bacteria strains isolated from the rhizosphere of *Colobanthus quitensis* ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 3$)



мл, $6,93 \pm 0,6$ мкг/мл,) виявлено у середовищі культивування ізолятів D387, D393, D395. Найнижчий ($1,13 \pm 0,1$ мкг/мл) – у середовищі культивування ізоляту D391 (рис. 3).

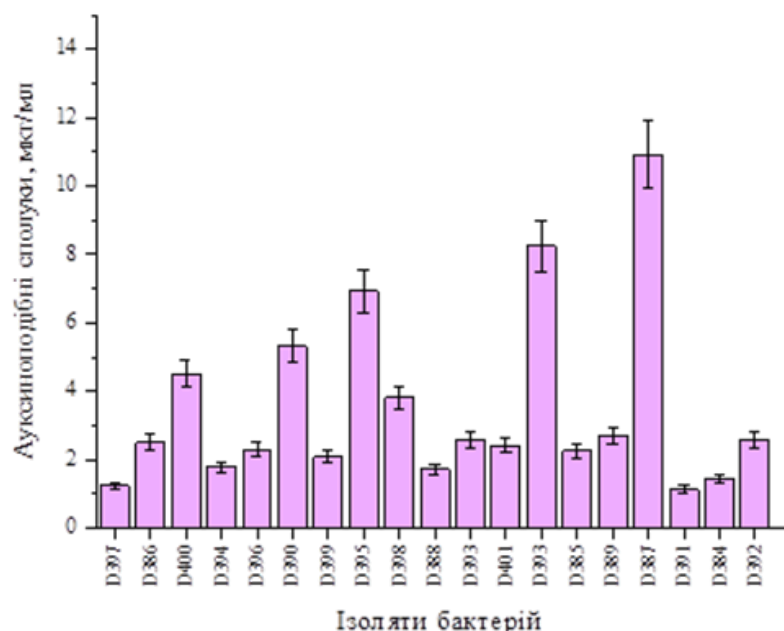


Рис. 3. Вміст ауксиноподібних сполук у середовищі вирощування ізолятів бактерій з ризосфери *Colobanthus quitensis* ($x \pm SD$, $n = 3$)

Fig. 3. Content of auxin-like compounds in the culture medium of bacterial isolates collected from the rhizosphere of *Colobanthus quitensis* ($x \pm SD$, $n = 3$)

Десять з дев'ятнадцяти ізолятів бактерій, виділених з ризосфери *C. quitensis* (D384, D388, D389, D391, D393, D395, D398, D400, D401 і D402), здатні фіксувати молекулярний азот. Солюбілізували ZnO ізоляти D388, D395, D396, D397, D400. Для ізоляту D400 було визначено найвищий індекс ($2,5 \pm 0,2$) солюбілізації ZnO, а найнижчий ($0,6 \pm 0,05$) – для ізоляту D397.

Тринадцять ізолятів розріджували желатин. Ізоляти D386, D388, D391, D395, D396, D397, D399, D400, D401, D402 виявляли амілолітичну активність. Найвищий індекс ензиматичної активності ($1,5 \pm 0,13$) визначено для ізоляту бактерій D399, а найнижчий – для ізоляту бактерій D396 ($0,5 \pm 0,045$). Індекс ензиматичної активності в інших ізолятів був у межах 0,8–1,2.

Ізоляти D386, D387, D390, D395, D399 і D400 виявляють ліпазну активність (здатні гідролізувати твін-20). Ізоляти D395, D396, D400 виявляють лецитиназну активність. Целюлази утворювали ізоляти D395 та D400. Індекс ензиматичної активності у цих ізолятів був у межах 1,0–1,8.

Стійкі до впливу сполук важких металів ізоляти бактерій D388, D389, D390, D391, D394, D395, які утворювали ауксиноподібні сполуки, сидерофори, та виявляли ензиматичну активність, відібрали для дослідження впливу на ріст ярої пшениці *Triticum aestivum* сорту Tybalt. Насіння пшениці упродовж 12 годин бактеризували суспензіями досліджених ізолятів бактерій, після

чого висівали у ґрунт. За контроль була пшениця, насіння якої витримували 12 годин у 0,9% розчині NaCl. Пшеницю вирощували упродовж 14 діб. На 3-тю і 8-му доби росту пшениці визначали схожість насіння, а на 14 добу росту – вологість, морфометричні параметри, вміст пігментів у листках проростків.

Інокуляція насіння пшениці ізолятами бактерій з ризосфери *C. quitensis* позитивно впливала на окремі показники. У разі інокуляції насіння пшениці ізолятами бактерій D388 і D391 незначно збільшувалася схожість насіння пшениці, порівняно з контролем. Інокуляція насіння пшениці ізолятом D395 і D389 не зумовлювала значних змін схожості. Після оброблення насіння пшениці ізолятом бактерій D390 схожість насіння пшениці знижувалася, порівняно з контролем (табл. 1).

Таблиця 1

Схожість насіння, вологість та суха маса листків ярої пшениці *Triticum aestivum* сорту Tybalt, інокульованої ізолятами бактерій, виділеними з ризосфери *Colobanthus quitensis* ($\bar{x} \pm SD$, $n = 3$)

Table 1

Seed germination, moisture content and dry weight of leaves of spring wheat *Triticum aestivum* cultivar Tybalt, inoculated with bacterial isolates collected from the rhizosphere of *Colobanthus quitensis* ($\bar{x} \pm SD$, $n = 3$)

Ізоляти бактерій	Схожість, %	Вологість, %	Суха маса, %
Контроль	84 $\pm$ 3	87,0 $\pm$ 2,61	12,6 $\pm$ 0,38
D388	88 $\pm$ 4	98,7 $\pm$ 2,96	9,4 $\pm$ 0,28
D389	78 $\pm$ 6	88,0 $\pm$ 2,64	12,2 $\pm$ 0,43
D390	58 $\pm$ 2	89,0 $\pm$ 2,67	11,5 $\pm$ 0,37
D391	89 $\pm$ 3	89,8 $\pm$ 2,69	7,7 $\pm$ 0,23
D394	72 $\pm$ 3	88,6 $\pm$ 2,66	11,5 $\pm$ 0,34
D395	80 $\pm$ 3	87,9 $\pm$ 2,64	11,2 $\pm$ 0,34

Вологість та суха маса проростків пшениці, насіння якої було інокульоване дослідженими ізолятами, незначно відрізнялися від показників пшениці, обробленої 0,9% NaCl.

Довжина кореня 14-добових проростків пшениці, обробленої 0,9% NaCl, не перевищувала 170 мм, а довжина пагона – 200 мм. Довжина кореня пшениці, насіння якої було оброблено ізолятами бактерій D391, D388, D395, D394 і D390, була на 5–15% нижчою, порівняно з контролем. Оброблення насіння пшениці ізолятом бактерій D389 зумовлювало незначне збільшення довжини кореня, порівняно з контролем. Отже, довжина пагона 14-добових проростків пшениці, насіння якої обробили ізолятами бактерій з ризосфери *C. quitensis*, не значно відрізнялася від контролю (рис. 4). Загальний вміст хлорофілу у листках 14-ти добових проростків пшениці у контролі становив 800 $\pm$ 55 мкг/г сирої маси рослини (рис. 5).



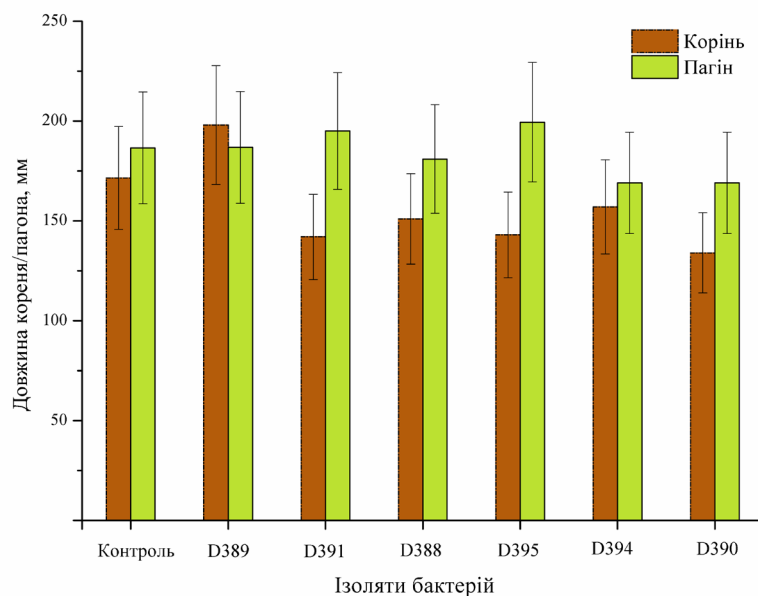


Рис. 4. Довжина кореня та пагона *Triticum aestivum* сорту Tybalt, насіння якої обробили ізолятами бактерій з ризосфери *Colobanthus quitensis* ($\bar{x} \pm SD$, $n=3$)

Fig. 4. Root and shoot length of *Triticum aestivum* cultivar Tybalt, whose seeds were treated with bacterial isolates from the rhizosphere of *Colobanthus quitensis* ($\bar{x} \pm SD$, $n=3$)

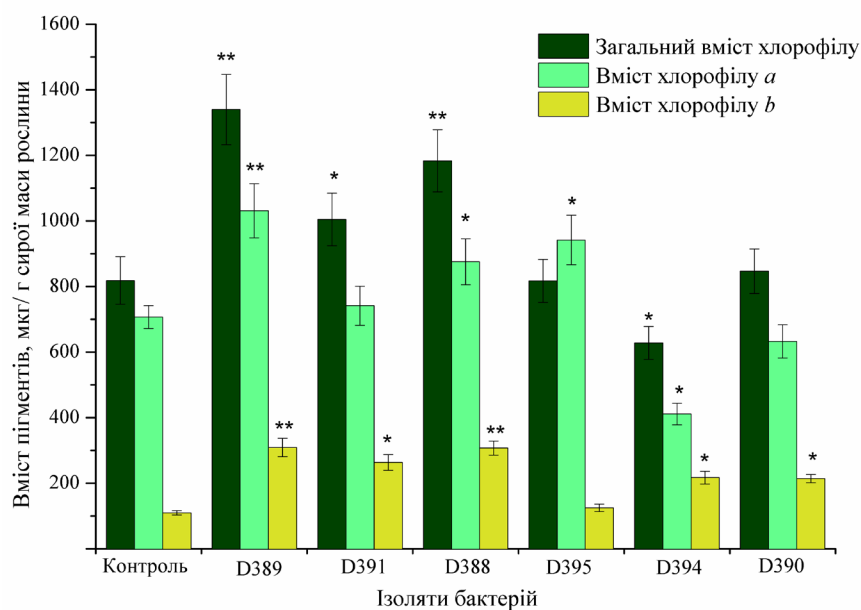


Рис. 5. Вміст пігментів у листках *Triticum aestivum* сорту Tybalt, насіння якої обробили ізолятами бактерій з ризосфери *Colobanthus quitensis* ($\bar{x} \pm SD$, $n=3$, * – $p \leq 0,05$ – вірогідні зміни вмісту хлорофілу, порівняно з контролем)

Fig. 5. Pigment content in leaves of *Triticum aestivum* cultivar Tybalt whose seeds were treated with bacterial isolates from the rhizosphere of *Colobanthus quitensis* ($\bar{x} \pm SD$, $n=3$, * – $p < 0.05$ – probable differences in chlorophyll content compared to the control)

Загальний вміст хлорофілу був найбільшим у листках пшениці, обробленої ізолятами D389 та D388. Вміст хлорофілу *a* у листках пшениці, обробленої ізолятами D389, D395 і D388 був на 13,4–28,7% вищим, порівняно з контролем (рис. 5). Вміст хлорофілу *b* у листках пшениці, бактеризованої усіма ізолятами, окрім D395, були вищими, порівняно з контролем.

Таким чином, у результаті роботи виділили металорезистентні галотолерантні ізоляти бактерій із ризосфери *C. quitensis*, які виявляють фітостимулювальний вплив на ріст пшениці. За здатністю синтезувати сидерофори, ауксиноподібні сполуки, фіксувати молекулярний азот, солубілізувати ZnO, стимулювати ріст *T. aestivum*, наявністю амілазної активності для ідентифікації та перевірки у складі бактерійного препарату відібрали ізолят D388.

Автори вдячні докт. біол. наук І. Ю. Парнікозі з Національного антарктичного центру МОН України за відбір антарктичних зразків та приватному підприємству «Західний Буг» (Львівська область, Україна) за надання насіння *T. aestivum* сорту Tybalt.

Робота виконана за Державною цільовою науково-технічною програмою проведення досліджень в Антарктиці на 2011–2025 роки.

O. D. Maslovska, S. Y. Komplikevych, V. H. Buniak,
O. M. Moroz, S. O. Hnatysh

Ivan Franko National University of Lviv,
4, Hrushevsky Str., Lviv, 79005, Ukraine,
e-mail: svitlana.hnatysh@lnu.edu.ua

PLANT GROWTH-PROMOTING PROPERTIES OF HEAVY METAL RESISTANT BACTERIA ISOLATED FROM THE RHIZOSPHERE OF *COLOBANTHUS QUITENSIS* (KUNTH) BARTL. (DECEPTION ISLAND, MARITIME ANTARCTICA)

Summary

Considering climate change and soil pollution caused by human activity, including hostilities, the isolation of plant growth-promoting microorganisms resistant to environmental factors is a current issue. Environments with extreme conditions are a source for the isolation of microorganisms that may have potential for use in biotechnology. **Aim of the study:** to study the ability of metal-resistant halotolerant bacterial isolates from the rhizosphere of *C. quitensis* (Kunth) Bartl. (Deception Island, Maritime Antarctic) to synthesize siderophores and auxin-like compounds, fix molecular nitrogen, solubilize zinc compounds, synthesize certain enzymes, and stimulate the growth of spring wheat *Triticum aestivum* of the Tybalt variety, as well as to select promising strains for identification and inclusion in microbial preparations. **Materials and methods.** Bacterial isolates were purified, and their properties were studied using classical microbiological methods. The ability to produce siderophores was detected using chromazuril S and hexadecyltrimethylammonium bromide, while auxin-like compounds were detected using Salkovsky's reagent. Wheat seeds were inoculated with bacterial suspensions and sown into the soil. Seed germination, moisture content, dry



weight, pigment content in leaves, and morphometric parameters of seedlings were studied. **Results.** Six of the 19 selected halotolerant metal-resistant bacterial isolates that produced siderophores, auxin-like compounds, and enzymatic activity (D388 and D391 – amylase, D389 and D394 – protease, D390 – lipase, D395 – protease, amylase, lipase, lecithinase, cellulase) were chosen for study of their effect on wheat growth. The total chlorophyll content was the highest in wheat leaves treated with isolates D389 and D388. The chlorophyll a content in wheat leaves treated with isolates D389, D395, and D388 was 13.4–28.7% higher than in the control. The highest content of siderophores was found in the culture medium of isolate D388 (10.94 ± 1.2 conventional units), and auxin-like compounds (10.93 ± 1.0 $\mu\text{g/ml}$) – in isolate D387. **Conclusions.** Metal-resistant halotolerant isolates of bacteria from the rhizosphere of *C. quitensis* have a growth-promoting effect on wheat. Based on their ability to synthesize siderophores, auxin-like compounds, fix N_2 , solubilize ZnO, have amylase activity, and stimulate the growth of *T. aestivum*, isolate D388 was selected for identification and testing as part of a bacterial preparation.

Key words: Antarctic microorganisms, plant growth-promoting bacteria, siderophores, auxin-like compounds, metal-resistant microorganisms.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Властивості бактерій, виділених з ризосфери *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (о. Десепшн, Морська Антарктика): кваліфікаційна робота (бакалаврська) / Буняк Василина Григорівна; Львівський національний університет імені Івана Франка, кафедра мікробіології. – Львів, 2025. – 48 с.
2. Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Яворська Г.В., Білінська І.С., Борсукевич Б.М. Практикум з мікробіології. – Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2014. – 436 с.
3. ДСТУ 4138–2002. Насіння сільськогосподарських культур: методи визначення якості: чинний від 01.01.2004. – К.: Держспоживстандарт України, 2003. – 170 с.
4. Петровська І.Р., Салига Ю.Т., Вудмаска І.В. Статистичні методи в біологічних дослідженнях: навчально-методичний посібник. – Київ: Аграрна наука, 2022. – 172 с.
5. Романюк Н.Д., Цвілінюк О.М., Микієвич І.М., Терек О.І. Фізіологія рослин: навчальний практикум для студентів біологічного факультету. – Львів: Піраміда, 2005. – 160 с.
6. Acuña-Rodríguez I.S., Hansen H., Gallardo-Cerda J., Atala C., Molina-Montenegro M.A. Antarctic extremophiles: biotechnological alternative to crop productivity in saline soils // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2019. – Vol. 7. – P. 22. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00022>
7. Ahmed S., Rahman M.S., Hasan M.M., Paul N., Sajib A.A. Microbial degradation of lignocellulosic biomass: discovery of novel natural lignocellulolytic bacteria // *BioTechnologia*. – 2018. – Vol. 99, No 2. – P. 137–146. <https://doi.org/10.5114/bta.2018.75657>
8. Arora N.K., Verma M. Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria // *Biotechnology*. – 2017. – Vol. 7. – P. 381. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1008-y>



9. Ausuri J., Dell'Anno F., Vitale G.A., Palma Esposito F., Funari V., Franci G., Galdiero M., Della Sala G., Tedesco P., Coppola D., de Pascale D. Bioremediation of multiple heavy metals mediated by Antarctic marine isolated *Dietzia psychrocaliphila* J11D // Journal of Marine Science and Engineering. – 2022. – Vol. 10, No 11. – P. 1669. <https://doi.org/10.3390/jmse10111669>
10. Bhakat K., Chakraborty A., Islam E. Characterization of zinc solubilization potential of arsenic tolerant *Burkholderia* spp. isolated from rice rhizospheric soil // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2021. – Vol. 37, No 3. – P. 39. doi: 10.1007/s11274-021-03003-8
11. Biliavska L., Iutynska G., Loboda M., Ropotilov B., Skrotskyi S. Diagnostics and bioremediation of soils affected by military operations in Ukraine // Biological Systems: Theory and Innovation. – 2024. – Vol. 15, No 3. – P. 67–78. <https://doi.org/10.31548/biologiia/3.2024.67>
12. Gang S., Sharma S., Saraf M., Buck M., Schumacher J. Analysis of indole-3-acetic acid (IAA) production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski method // Bio-protocol. – 2019. – Vol. 9, No 09. – P. e3230. doi: 10.21769/BioProtoc.3230
13. Gómez-Godínez L.J., Aguirre-Noyola J.L., Martínez-Romero E., Arteaga-Garibay R.I., Ireta-Moreno J., Ruvalcaba-Gómez J.M. A look at plant-growth-promoting bacteria // Plants. – 2023. – Vol. 12, No 8. – P. 1668. <https://doi.org/10.3390/plants12081668>
14. Hasan Md. M., Marzan L. W., Hosna A., Hakim A., Azad A. K. Optimization of some fermentation conditions for the production of extracellular amylases by using *Chryseobacterium* and *Bacillus* isolates from organic kitchen wastes // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. – 2017. – Vol. 15, No 1. – P. 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.009>
15. Lougen B.C., Haarmann D., Lynne A.M. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection // Journal of Microbiology and Biology Education. – 2011. – Vol. 20, No 1. – P. 51–53. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v12i1.249>
16. Mudryk Z.J. Decomposition of organic and solubilisation of inorganic phosphorus compounds by bacteria isolated from a marine sandy beach // Marine Biology. – 2004. – Vol. 145. – P. 1227–1234. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1397-4>
17. Nautiyal C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms // FEMS Microbiology Letters. – 1999. – Vol. 170, No 1. – P. 265–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
18. Pandey S.S., Singh P., Samal B., Verma R.K., Chatterjee S. Xanthoferrin siderophore estimation from the cell-free culture supernatants of different *Xanthomonas* strains by HPLC // Bioprotocol. – 2017. – Vol. 7, No 14. – P. e2410. doi: 10.21769/BioProtoc.2410
19. Pérez-Miranda S., Cabirol N., George-Téllez R., Zamudio-Rivera L.S., Fernández F.J. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection // Journal of Microbiological Methods. – 2007. – Vol. 70, No 1. – P. 127–131. doi: 10.1016/j.mimet.2007.03.023



20. Souza Rd., Ambrosini A., Passaglia L.M. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils // *Genetics and Molecular Biology*. – 2015. – Vol. 38, No 4. – P. 401–419. doi: 10.1590/S1415-475738420150053
21. Wang G., Ren Y., Bai X., Su Y., Han J. Contributions of beneficial microorganisms in soil remediation and quality improvement of medicinal plants // *Plants*. – 2022. – Vol. 11, No 23. – P. 3200. <https://doi.org/10.3390/plants11233200>
22. Yerkhova A., Parnikoza I., Pavlovska M., Yevchun H., Prekrasna-Kviatkovska Y. Microbiomes of Antarctic pearlwort (*Colobanthus quitensis*) of the maritime Antarctic: distinct diversity and core microbes in rhizosphere and endosphere compartments of the plant // *Ukrainian Antarctic Journal*. – 2022. – Vol. 20, № 2(25). – P. 212–240. <https://doi.org/10.33275/1727-7485.2.2022.70>

REFERENCES

1. Bunyak VH. Properties of bacteria isolated from the rhizosphere of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Deception Island, Maritime Antarctic): qualification work (bachelor's degree). Ivan Franko National University of Lviv, Department of Microbiology. Lviv, 2025; 48 p. [in Ukrainian].
2. Hudz SP, Hnatush SO, Yavorska HV, Bilinska IS, Borsukevych BM. Guidebook on microbiology. – Lviv: LNU imeni Ivana Franka, 2014; 436 p. [in Ukrainian].
3. DSTU 4138–2002. Seeds of agricultural crops: methods for determining quality: valid from 01.01.2004. Kyiv: Derzhspozhyvstandart Ukrainy, 2003; 170 p. [in Ukrainian].
4. Petrovska IR, Salyha YuT, Vudmaska IV. Statistical methods in biological research: a teaching and methodological manual. Kyiv: Ahrarna nauka, 2022; 172 p. [in Ukrainian].
5. Romaniuk ND, Tsvilyniuk OM, Mykiiievych IM, Terek OI. Plant physiology: teaching workshop for students of biological faculty. Lviv: Piramida, 2005; 160 p. [in Ukrainian].
6. Acuña-Rodríguez IS, Hansen H, Gallardo-Cerda J, Atala C, Molina-Montenegro MA. Antarctic Extremophiles: Biotechnological Alternative to Crop Productivity in Saline Soils. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019;7:22. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00022>
7. Ahmed S, Rahman MS, Hasan MM, Paul N, Sajib AA. Microbial degradation of lignocellulosic biomass: discovery of novel natural lignocellulolytic bacteria. *BioTechnologia*. 2018;99(2):137–146. <https://doi.org/10.5114/bta.2018.75657>
8. Arora NK, Verma M. Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. *Biotechnology*. 2017;7:381. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1008-y>
9. Ausuri J, Dell'Anno F, Vitale GA, Palma Esposito F, Funari V, Franci G, Galdiero M, Della Sala G, Tedesco P, Coppola D, de Pascale D. Bioremediation of multiple heavy metals mediated by Antarctic marine isolated *Dietzia psychrhalcaliphila* J11D. *Journal of Marine Science and Engineering*. 2022;10(11):1669. <https://doi.org/10.3390/jmse10111669>



10. Bhakat K, Chakraborty A, Islam E. Characterization of zinc solubilization potential of arsenic tolerant *Burkholderia* spp. isolated from rice rhizospheric soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2021;37(3):39. doi: 10.1007/s11274-021-03003-8
11. Biliavska L, Iutynska G, Loboda M, Ropotilov B, Skrotskyi S. Diagnostics and bioremediation of soils affected by military operations in Ukraine. *Biological Systems: Theory and Innovation*. 2024;15(3):67–78. <https://doi.org/10.31548/biologiia/3.2024.67>
12. Gang S, Sharma S, Saraf M, Buck M, Schumacher J. Analysis of indole-3-acetic acid (IAA) production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski method. *Bio-protocol*. 2019;9(09):e3230. doi: 10.21769/BioProtoc.3230
13. Gómez-Godínez LJ, Aguirre-Noyola JL, Martínez-Romero E, Arteaga-Garibay RI, Ireta-Moreno J, Ruvalcaba-Gómez JM. A look at plant-growth-promoting bacteria. *Plants*. 2023;12(8):1668. <https://doi.org/10.3390/plants12081668>
14. Hasan MdM, Marzan LW, Hosna A, Hakim A, Azad AK. Optimization of some fermentation conditions for the production of extracellular amylases by using *Chryseobacterium* and *Bacillus* isolates from organic kitchen wastes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2017;15(1):59–68. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.009>
15. Lougen BC, Haarmann D, Lynne AM. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology and Biology Education*. 2011;20(1):51–53. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v12i1.249>
16. Mudryk ZJ. Decomposition of organic and solubilisation of inorganic phosphorus compounds by bacteria isolated from a marine sandy beach. *Marine Biology*. 2004;145:1227–1234. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1397-4>
17. Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 1999;170(1):265–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
18. Pandey SS, Singh P, Samal B, Verma RK, Chatterjee S. Xanthoferrin siderophore estimation from the cell-free culture supernatants of different *Xanthomonas* strains by HPLC. *Bioprotocol*. 2017;7(14):e2410. doi: 10.21769/BioProtoc.2410
19. Pérez-Miranda S, Cabirol N, George-Téllez R, Zamudio-Rivera LS, Fernández FJ. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*. 2007;70(1):127–131. doi: 10.1016/j.mimet.2007.03.023
20. Souza Rd, Ambrosini A, Passaglia LM. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*. 2015;38(4):401–419. doi: 10.1590/S1415-475738420150053
21. Wang G, Ren Y, Bai X, Su Y, Han J. Contributions of beneficial microorganisms in soil remediation and quality improvement of medicinal plants. *Plants*. 2022;11(23):3200. <https://doi.org/10.3390/plants11233200>
22. Yerkhova A, Parnikoza I, Pavlovska M, Yevchun H, Prekrasna-Kviatkovska Y. Microbiomes of Antarctic pearlwort (*Colobanthus quitensis*) of the



maritime Antarctic: distinct diversity and core microbes in rhizosphere and endosphere compartments of the plant. *Ukrainian Antarctic Journal*. 2022;20(2(25)):212–240. <https://doi.org/10.33275/1727-7485.2.2022.70>

Стаття надійшла до редакції 05.08.2025 р.

