

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**Факультет біології, географії та екології**  
**Кафедра ботаніки**

**ВПЛИВ ФОСФАТРОЗЧИННИХ БАКТЕРІЙ НА ЗАСВОЄННЯ**  
**ФОСФОРУ РОСЛИНАМИ**

Кваліфікаційна робота (проект)  
на здобуття ступеня вищої освіти “бакалавр”

Виконала: студентка 4 курсу 411  
групи

Рівень вищої освіти: перший  
(бакалаврський)

Спеціальності 091 Біологія  
Освітньо-професійної програми  
«Біологія»

Журавська Валерія Володимирівна

Керівник: доктор філософії

Дармостук Валерій Вікторович

Рецензент: завідувач кафедри ботаніки та  
екології рослин Харківського

Національного Університету ім. В.Н.

Каразіна, к.н.б., доц. Громакова А.Б.

**ЗМІСТ**

<b>ВСТУП</b>	<b>3</b>
<b>РОЗДІЛ 1.</b>	<b>5</b>
<b>СУЧАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЩОДО ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКІВ ФОСФАТРОЗЧИННИХ БАКТЕРІЙ ТА РОСЛИН</b>	<b>5</b>
1.1 Особливості фосфатрозчинних бактерій	5
1.2. Механізми розчинення фосфору фосфатрозчинними бактеріями.	8
<b>РОЗДІЛ 2.</b>	<b>13</b>
<b>МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ</b>	<b>13</b>
2.1 Організація дослідження	13
2.2 Підготовка експерименту	14
<b>РОЗДІЛ 3.</b>	<b>27</b>
<b>ВПЛИВ ФОСФАТРОЗЧИННИХ БАКТЕРІЙ НА ЗАСВОЄННЯ ФОСФОРУ РОСЛИНАМИ</b>	<b>27</b>
3.1 Статистичний аналіз отриманих експериментальних результатів	27
3.2 Відповідність отриманих даних до літературних джерел та їх обговорення	31

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Фосфор є невід'ємним поживним елементом для рослин, відіграючи ключову роль у біохімічних процесах клітини. Його участь у структурних компонентах нуклеїнових кислот, таких як ДНК та РНК, та у молекулах АТФ, фундаментального енергетичного переносника, свідчить про важливість фосфору у генетичному та енергетичному обміні рослин. Забезпечення рослин фосфором є критичним для їхнього росту, розвитку та продуктивності. Поглинання фосфоровмісних сполук рослиною відбувається за допомогою кореневої системи, проте рівень доступного фосфору в ґрунті є досить низьким.

У контексті фіксації фосфору для рослин, мікроорганізми відіграють значну роль, особливо група фосфорозчинних бактерій. Ці бактерії мають здатність виділяти органічні кислоти та ензими, які сприяють мобілізації фосфору у ґрунті за рахунок мінералізації фосфоровмісних сполук або перетворення їх у хелатні комплекси. Ці процеси сприяють збільшенню поглинання та використання фосфору рослинами, що позитивно впливає на процеси їхнього росту, розвитку та врожайності. Таким чином, роль бактерій у цьому процесі є критичною для забезпечення оптимального використання фосфору в сільському господарстві та сталого виробництва сільськогосподарських культур. Сучасні дослідження спрямовані на вивчення механізмів впливу фосфатрозчинних бактерій на рослини, визначення оптимальних штамів для фіксації фосфору та широкої імплементації цих штамів сільськогосподарське виробництво. Також, неодноразово показано переважання цих бактерій у екстремальних умовах (дифіцит вологи або засолення) у природних екосистемах, що може вказувати на роль цих мікроорганізмів у механізмах адаптації рослин до перенесення несприятливих умов. Саме тому, дослідження цих бактерій та механізмів їх впливу на рослин є актуальним завданням для покращення

продуктивності культурних рослин на малопродатних та бідних місцезростаннях.

**Мета дослідження:** встановлення чи сприяють фосфатрозчинні бактерії кращому засвоєнню фосфору рослинами в умовах дефіциту фосфору та різного рівня вологості ґрунту.

Для досягнення поставленої мети були виділені такі **завдання:**

- Проаналізувати літературні джерела щодо впливу фосфатрозчинних бактерій на поглинання фосфору рослинами та механізмів цієї взаємодії.

- Сформулювати детальну схему проведення експерименту з визначення впливу фосфатрозчинних бактерій.

- Провести статистичну обробку результатів проведених експериментальних досліджень, які були отримані під час наукової практики в Кельнському університеті.

- Визначити оптимальні умови вологості для засвоєння фосфору рослинами.

**Об'єкт дослідження:** механізм фосфатрозчинних бактерій на поглинання фосфору рослинами.

**Предмет дослідження:** засвоєння фосфору рослиною *Arabidopsis thaliana* під впливом бактерії *Pseudomonas fluorescens* в умовах різного рівня вологості.

**Структура та обсяг роботи.** Робота складається зі вступу, трьох розділів, висновків та списку використаних джерел. Основний зміст роботи викладений на 32 сторінках комп'ютерного тексту. Список використаних джерел включає 35 іншомовних найменувань.

## РОЗДІЛ 1.

### СУЧАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЩОДО ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКІВ ФОСФАТРОЗЧИННИХ БАКТЕРІЙ ТА РОСЛИН

#### 1.1 Особливості фосфатрозчинних бактерій

Фосфатрозчинні організми – це група організмів, які здатні перетворювати нерозчинні форми фосфору, такі як фосфати, у форму, яка доступна для рослин. Фосфатрозчинні бактерії (ФРБ), є найпоширенішими серед цих мікроорганізмів, становлячи від 1% до 50% фосфатрозчинних мікроорганізмів у ґрунті (*Acinetobacter* spp., *Agrobacterium* spp., *Bacillus* spp., *Micrococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp., *Serratia* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Streptomyces* spp.). Фосфатсолубілізуючі бактерії широко поширені у ґрунті та ризосфері і грають важливу роль у циклі поживних речовин та родючості ґрунту [28]. Фосфатрозчинні актиноміцети складають приблизно від 15% до 45%, у той час як гриби, що розчиняють фосфор, складають лише від 0,1% до 0,5% (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. та *Penicillium* spp.) [28, 20, 22].

У 20-му столітті було зафіксовано взаємозв'язок між мікроорганізмами та рівнем доступного для рослин фосфору в ґрунті. У 1948 році було виявлено, що мікроорганізми впливають на поглинання фосфору рослинами, що може сприяти їхньому росту.. У 1950-х роках був зроблений прогрес у вивченні механізму солубілізації фосфору, показавши, що бактерії можуть виділяти різні органічні кислоти та їхнє дефосфорилуюча здатність залежить від рН навколишнього середовища [20, 1].

Відкриття фосфатрозчинних бактерій дало нові можливості для розв'язання проблеми недостатнього фосфору в ґрунтах, оскільки ці бактерії грають ключову роль у циклі фосфору в ґрунті, перетворюючи

органічний фосфор через кислотну секрецію та гідроліз неорганічних фосфорних сполук. Це допомагає розчинити нерозчинні форми фосфору та збільшити доступний фосфор для рослин [20, 12]. Нещодавні дослідження підтверджують, що фосфатрозчинні бактерії здатні конвертувати недоступний фосфор у форму, доступну для рослин, за допомогою різних механізмів [20]. Зокрема, це такі механізми як вироблення ферментів (фітази та фосфатази), кислот (органічних, неорганічних) та хелатуючих (сидерофори, позаклітинні полісахариди) сполук [20, 12, 18]. Крім того, фосфатрозчинні бактерії можуть діяти синергетично з фосфорними добривами, поліпшуючи ефективність фосфору та збільшуючи рівень фертильності ґрунту [20, 27, 16].

Загалом, фосфатрозчинні бактерії, головним чином, є грамнегативними. Відповідно до форми та походження субстрату, що містить фосфор, бактерії можна розділити на дві основні групи: органічні ФРБ можуть перетворювати органічний фосфор; неорганічні ФРБ можуть перетворювати нерозчинний неорганічний фосфор у розчинний органічний фосфор.

Багато ФРБ також мають можливість розчинити неорганічний фосфор та одночасно мінералізувати органічний фосфор [20, 26].

Загалом, хоч фосфат розчинні бактерії і є найчисельнішими, проте їх розподіл значно залежить від різних факторів, таких як властивості ґрунту, типи середовища існування та вплив ризосфери. Зараз використовується високоефективна технологія секвенування для оцінки кількості груп ФРБ, щоб з'ясувати їх розподіл та аналізувати різноманітність. Ці відмінності в розподілі безпосередньо впливають на різноманітність та кількість ФРБ в ґрунті [20, 3]. Вплив різних факторів на розподіл ФРБ варіює досить сильно. Сучасні дослідження показали наявність *Bacillus* spp., *Pseudocystis* spp. та *Burkholderia* spp. у різних типах ґрунтів, таких як чайні сади, засолені ґрунти, ґрунти з важкими металами, лісові ґрунти, а також у ризосферних ґрунтах

сільськогосподарських культур, де вони представлені численно та мають високу здатність розчиняти фосфоровмістні сполуки [20, 23]. Деякі інші види, такі як *Enterobacter*, *Salmonella*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Thiobacillus*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacteriaceae*, *Serratia marcescens* та *Baeyerlingia*, також присутні у ґрунті [20, 6]. Дослідження, що були зосереджені на визначенні бактеріальних угруповань на коренях та листах *Arabidopsis* дозволили встановити суттєве перекриття цих угруповань [17]. Зокрема, за результатами дослідження особливостей ізолятів бактерій та їх генетичного матеріалу було виявлено, що функціональні можливості цих бактерій мають суттєве перекриття, але з деякими відмінностями на рівні окремих функцій. Дослідники показали, що бактерії, отримані з листя та кореня, можуть утворювати угруповання, схожі на природні мікробіоти рослини на її різних органах, проте вони також можуть ектопічно колонізувати інші частини рослини. Це дослідження дає підстави вважати, що мікробіота спеціалізується для певних ролей у різних частинах рослини, що впливає на її фізіологію та функціонування [17].

Різноманітність видів та потужність фосфатрозчинних бактерій (ФРБ), виділених із різних типів екосистем також відрізняються. Зокрема, у кількох дослідженнях було простежено вісім видів ФРБ у лісових ґрунтах, з яких більше однієї третини належали до роду *Burkholderia*, і всі вони виявили здатність розчиняти фосфати [20, 24]. У той же час, фосфатрозчинні бактерії які були ізольовані з рослин олійного чаю переважно були представлені родом *Bacillus*, а *Bacillus ayabatensis* (NC285) виділявся за найбільшою здатністю розчиняти неорганічний фосфор [20, 19]. Робота по скринінгу ризосферних угруповань плодівих дерев, що поширені на карстовим та некарстовим місцезростаннях дозволили виявити, що чисельність ФРБ була вищою на карстових біотопах. Також, деякі види, наприклад *Pseudomonas* spp., присутні у сусідніх як карстових, так і некарстових біотопах, у той же час інші, такі

як *Fusobacterium* spp. та *Burkholderia* spp., було виділено виключно у місцевостях з карстовими біотопами. Такі дослідження показали, значну біотопічну спеціалізацію ризосфери рослин та збільшення чисельності ФРБ у місцезростаннях з посушливими умовами [20, 30].

Наразі уявлення про розподіл та закономірності бактерій, які розчиняють фосфор, є досить фрагментарним та потребує подальших значних досліджень. ФРБ є найбільшою частиною мікроорганізмів, що здатні розчинити фосфор, і вони поширені по всьому світу. Проте, в деяких недосліджених регіонах або екстремальних середовищах угруповання цих бактерій є невідомою. Загалом, культури цих організмів активно використовують для ефективного ведення сільського господарства. Інформація про подібне використання зібрана у таблиці 1.1.

## **1.2. Механізми розчинення фосфору фосфатрозчинними бактеріями.**

Механізми солубілізації фосфору в ґрунті в основному пов'язані з важливими процесами циклу фосфору, такими як розчинення–осадження, мінералізація–фіксація та адсорбція–десорбція. Більшість бактерій, що солубілізують фосфат, можуть здійснювати мінералізацію або гідроліз нерозчинного фосфату за допомогою ферментів та кислот, а також утворювати хелати або комплекси з катіонами металів, такими як  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , для звільнення іонів фосфату. Також невелика частина цих бактерій може змінювати рН навколишнього середовища, вивільнюючи гази (наприклад,  $\text{CO}_2$  через дихання та сірководень із ФРБ), щоб досягти ефекту солубілізації нерозчинного фосфату. У ґрунті ФРБ також може підвищувати вміст фосфору шляхом зміни мікробної спільноти, що призводить до збільшення різноманітності мікробного співтовариства та пов'язаних ферментів. Це в свою чергу впливає на вміст фосфору в ґрунті та поліпшує ріст культур і врожайність [20].



Таблиця 1.1

## Розподіл ФРБ у ризосферних ґрунтах різних видів культур

Види сіл-ких культур	Поширення	ФРБ	Вплив на врожайність	Джерело
Злаки	Ризосферний ґрунт кукурудзи	<i>Bacillus safensis</i> , <i>Falsibacillus pallidus</i>	Значно збільшилися довжина кореня, площа кореневої поверхні, об'єм кореня та кількість кореневих кінчиків	[20, 17]
Бобові	<i>Phaseolus vulgaris</i> , ризосферний ґрунт	<i>Pseudomonas kribbensis</i>	Біомаса різко зросла	[20, 10]
Садіві культур и	Ризосферний ґрунт томатів	<i>Acinetobacter</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Збільшено висоту рослин томатів і площу листя	[20, 7]
Товарні культур и	Ризосферний ґрунт тютюну	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Значне збільшення висоти рослини	[20, 13]

Дія ацидолізу, яка включає органічні та неорганічні кислоти, є ключовою для розчинення фосфору. Більшість бактерій, таких як ФРБ, виділяють органічні кислоти, які можуть утворювати хелати з іонами металів у підставі, таких як  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  підвищуючи доступність фосфору. Ці органічні кислоти конкурують з фосфатами за місце адсорбції фосфору, що сприяє підвищенню розчинності та доступності

мінеральних фосфатів. Ефективність цього процесу також залежить від природи органічних кислот, де трикарбонові та дикарбонові кислоти мають більшу ефективність, ніж інші кислоти. Різні ФРБ виділяють різні типи органічних кислот, які можуть мати різну адсорбційну здатність до фосфатів [20, 8]. ФРБ виділяють органічні кислоти, які впливають на коріння рослин [20, 11]. Цей ефект ризосфери збільшує бактеріальне різноманіття в ризосфері та змінює доступність фосфору в ґрунті. Кисле середовище, утворене органічними кислотами, сприяє збагаченню ФРБ і допомагає прискорити цей процес. Наприклад, яблучна та лимонна кислоти можуть сприяти колонізації коренів томатів *Pseudomonas fluorescens* та кавунів *Bacillus polymyxa* [20,2]. Дослідження утворення органічних кислот у взаємозв'язку коренева система рослин–ФРБ–коренева система рослин має велике значення для уточнення механізму солюбілізації фосфату. Навіть при наявних дослідженнях, які вказують на важливість секреції органічних кислот для ФРБ, існують різні точки зору. В одному з досліджень, було показано, що вміст органічних кислот в середовищі не завжди впливає на здатність ФРБ розчиняти фосфор [20, 33]. Інші групи дослідників стверджують, що використання ФРБ в надмірно кислих ґрунтах підвищує рН, але не виявлено позитивної зв'язку між органічними кислотами та здатністю розчиняти фосфат [20, 21]. Ці дослідження можуть вказувати на більш комплексний характер взаємодії ФРБ в різних умовах рН.

Мінералізація органічних сполук фосфору ферментами, що виділяються ФРБ, є ключовим механізмом відновлення фосфору. Однак різні гідролітичні ферменти беруть участь у мінералізації органічного фосфору у різний спосіб [20, 9]. Фосфатаза, відома також як фосфомоноліпаза, поділяється на три типи: кислу, лужну та нейтральну. Кислі фосфотрази є більш ефективним у мінералізації органічного фосфору в кислих ґрунтах із значенням рН менше 7. Лужні фосфатази головним чином каталізують гідроліз фосфоліпідів (тобто фосфоглюкози-

б та АТФ) і вивільняють неорганічний фосфор у ґрунтах із значенням рН вище 7. Нейтральні фосфатази, на відміну від кислих і лужних, не мають дуже вираженого впливу на мінералізацію і гідроліз фосфору. Фітаза, інша форма фосфатази, головним чином мінералізує органічний фосфор у фітаті. Оскільки складноєфірний зв'язок у фітаті досить стабільний, фосфатази не здатні повністю гідролізувати його, і він повинен бути перетворений фітазою у форму, яка може бути розщеплена фосфатазами, зрештою вивільняючи неорганічний фосфор вуглецево-фосфорна ліаза також приймає участь у мінералізації фосфорорганічних речовин, вивільняючи фосфор у вільній формі [20]. Хелатоутворення та комплексоутворення є двома важливими механізмами солюбілізації фосфору, які базуються на принципі зв'язування функціональної групи з катіонами металів у ґрунті, вивільняючи фосфат з метою солюбілізації фосфору. В даний час хелатоутворення та комплексоутворення виробляються головним чином через сидерофори, що виробляються бактеріями, що розчиняють фосфор, позаклітинними полісахаридами та розкладанням рослинних і тваринних залишків.

Сидерофори — це невеликі молекули з низькою молекулярною масою, і за низького тиску заліза бактерії, що розчиняють фосфати, виробляють сидерофори, які хелатують  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , у ґрунті, вивільняючи іони фосфату для розчинення фосфату [20, 5]. Створені комплекси здатні зв'язуватися з рецепторними білками-носіями заліза на клітинних мембранах для проникнення в клітини, що збільшує поглинання заліза рослинами та покращення росту рослин. Позаклітинні полісахариди, що виділяються ФРБ, є високомолекулярними цукровими полімерами, які прикріплені до бактеріальних поверхонь. Вони мають особливі аніонні функціональні групи (фосфатні, карбоксильні та сукцинатні групи) і значну кількість кислотних груп  $-\text{OH}$  і  $-\text{COOH}$  на поверхні, які можуть утворювати комплекси з катіонами важких металевих елементів в ґрунті [20]. Сучасні дослідження механізмів ФРБ

зосереджені переважно на бактеріях. Крім бактеріальних механізмів, зміни в поживних речовинах ґрунту також мають певний вплив на фосфоросолюбілізуючий ефект бактерій. З іншого боку, зв'язок між ФРБ та місцевими мікроорганізмами в ґрунті також може безпосередньо впливати на структуру та функцію ґрунтових мікроорганізмів, змінюючи трансформацію фосфору в ґрунті [20, 4].

Зміни в поживних речовинах ґрунту мають істотний вплив на чисельність угруповань бактерій, здатних до розчинення фосфору (ФРБ). Екзогенно внесені добрива покращують поживні речовини в ґрунті та можуть впливати на кількість бактеріальних спільнот, що розчиняють фосфат, через стехіометрію рН та С:N:P [20, 32]. Також, виявлено, що постійне екзогенне додавання неорганічного фосфору, біовугілля та органічного вуглецю підвищує рН, що сприяє збільшенню кількості угруповань ФРБ, що позитивно корелює з біомасою, вмістом фосфору та поглинанням фосфору [20, 25]. З іншого боку, вплив внесення азотних добрив на чисельність спільноти ФРБ не є однозначним; помірне внесення азотних добрив може поліпшити азотно-фосфорний баланс ґрунту та збільшити кількість угруповань ФРБ, проте великі концентрації азотних добрив можуть уповільнювати ріст і розмноження ФРБ. Втручання С, N і P призвели до різних змін рН і відповідних змін у структурі співтовариства ФРБ. Було показано, що рН ґрунту впливає на чисельність угруповань ФРБ. У кислому середовищі, яке містить більше протонів, легко вивільнити нерозчинний фосфор, тому велика кількість угруповань ФРБ не змінюється суттєво за нормальних обставин, тоді як у лужному середовищі, оскільки велика кількість залишкового фосфору іммобілізується зв'язуванням металу іонів кількість угруповань ФРБ значно зростає, сприяючи вивільненню нерозчинного фосфору; отже, чим вище значення рН ґрунту, тим більша чисельність спільноти ФРБ [20, 34]. Враховуючи це, важливо впроваджувати відповідні кількості азотних

добрив, які можуть підтримувати оптимальний баланс поживних речовин у ґрунті для більш ефективного росту та функціонування ФРБ.

## РОЗДІЛ 2.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1 Організація дослідження

Експериментальна робота проводилася в Кельнському університеті за програмою InnoBioDiv з 25.09.2023 по 19.11.2023 року. Всі зустрічі проходили на платформі ZOOM до 01.11.2023 року. На зустрічах було надано детальний інструктаж приблизний розклад дослідницької програми, де поетапно було розписано всі дії, яким повинні бути виконані. Організація включала наступні етапи:

**Перший етап – процес формування ідей (25.09.23-01.10.23).** Протягом першого тижня, студенти повинні були знайти тему, яка пов'язана з фізіологією рослин та буде для студента цікавою, також розробити до цієї теми дослідницьке питання, цілі та гіпотезу. На зустрічах з науковими керівниками, вони вислуховуючи кожного студента, стосовно його теми, інформували про можливості проведення експерименту – наявності обладнання, матеріалів, тощо.

**Другий етап – дослідження (2.10.23-8.10.23).** На цьому етапі студентів розділили на 2 групи, та за цей час потрібно було кожній групі обрати тему дослідження. Потрапивши в 2 групу, почались обговорювання стосовно тем, після котрих було прийнято рішення. За цей тиждень було створено лабораторний зошит, гугл документ, для внесення правок та додавання літературних джерел. Постійні онлайн-зустрічі для вдосконалення експерименту.

**Третій етап – підготовка експерименту (08.10.23-15.10.23).** На цьому тижні готувалися матеріали, розглядали, яку бактерію краще використовувати для експерименту. Підготовкою до експерименту

займалася член нашої команди, студентка Кельнського університету, також допомагали наші наукові керівники.

**Четвертий етап – початок експерименту (16.10.23-13.11.23).** На цьому етапі почалася висадка насінин та відтворення умов, які були прописані в плані експерименту.

**П'ятий етап – збір та аналіз рослинного матеріалу (13.11.23-19.11.23).** На цьому етапі за методами самого експерименту був розроблений аналіз рослинного матеріалу.

## 2.2 Підготовка експерименту

Експеримент проводили за підготовленим планом з використанням таких матеріалів.

Організми: *Arabidopsis thaliana* ( $\approx 288$  насінин) та Фосфаторозчинні бактерії (*Pseudomonas fluorescens*)

### Хімічні речовини:

- Субстрат (суміш ґрунту та піску - 20:80), 61,2 кг
- Гідроксиапатит
- Добриво Хогланда:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4$ , мікроелементи, Fe-секвестр,  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 М  $\text{HCl}$
- Середовище R2A: Протеїновий пептон, Казамінові кислоти, Дріжджовий екстракт, Декстроза, Розчинний крохмаль, Дифосфат калію, Сульфат магнію, Піруват натрію, Агар
- Середовище LB: Дріжджовий екстракт, триптон, натрію хлорид
- Середовище Піковського: Дріжджовий екстракт, декстроза, фосфат кальцію, сульфат амонію, хлорид калію, сульфат магнію, сульфат марганцю, сульфат заліза, агар

- Фітатний агар: Глюкоза, аміачна селітра, фітат кальцію,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $KCl$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ , агар

Обладнання: 72 горщики, 6 лотків для FarmBot; Стерилізована суміш ґрунту та піску (8:2); Датчики вологості ґрунту.

Визначення активності фосфорної солюбілізації *Pseudomonas* використовували такі поживні середовища:

- LB-середовище: 10 г триптон, 5 г дріжджового екстракту, 10 г  $NaCl$

- Фітатне середовище: 1,5% глюкози, 0,5%  $NH_4NO_3$ , 0,5% фітату кальцію, 0,05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,05%  $KCl$ , 0,001%  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,001%  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ , 2,0% агар.

- Середовище Піковської (1 л): Глюкоза, 10 г;  $Ca_3(PO_4)_2$ , 5 г;  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,5 г;  $NaCl$ , 0,2 г;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,1 г;  $KCl$ , 0,2 г; дріжджовий екстракт, 0,5 г;  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0,002 г;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,002 г; 1,5% бакто-агар (Difco Laboratories, Детройт, штат Мічиган, США)

Також для експерименту знадобиться 6 протестованих груп:

- 1) лоток з горщиками 1-12, позначеними як "30 "-"", що означає 30% водоутримуючої здатності і без додавання бактерій в субстрат в цих горщиках;

- 2) лоток з горщиками 13-24, позначений як "30 "+", що означає 30% вологості та додавання бактерій у субстрат у цих горщиках; (етикетки решти лотків мають таке ж значення)

- 3) лоток з горщиками 25-36 з позначкою "50 "-"

- 4) лоток з горщиками 37-48, позначений як "50 "+"

- 5) лоток з горщиками 49-60 з позначкою "75 "-"

- 6) лоток з горщиками 61-72 з позначкою "75 "+"

Приблизно 800 г піщано-ґрунтової суміші буде поміщено в кожен горщик і додано 38 мг гідроксиапатиту. Загальна схема експерименту представлена на рисунку 2.1



## 1. Підготовка горщиків.

Субстратна суміш із стерилізованого піску та ґрунту у співвідношенні 8:2 була підготовлена. Всього 72 горщики були пронумеровані від 1 до 72 і розміщені на шести лотках. Для створення дренажного шару в кожному горщику було використано дві частини розірваних паперових рушників. Потім горщики було заповнено приблизно 800 г субстратної суміші.

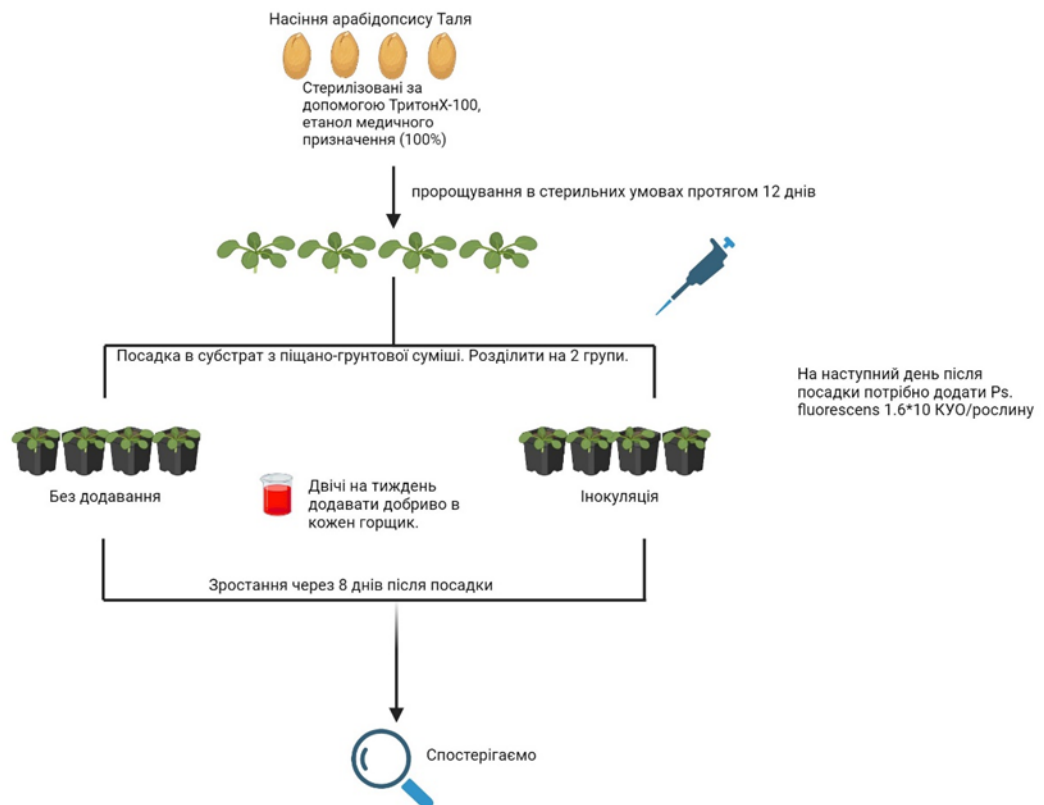


Рис. 2.1. Схематичний рисунок експерименту.

## 2. Стерилізація насіння.

Було взято 3 пробірки Еппендорф (1,5 мл), в які було додано приблизно насіння *Arabidopsis thaliana* (загалом приблизно 200-300 насінин). Всі подальші дії виконувалися на стерильному робочому столі.

- Перше промивання: Був підготовлений розчин 70% етанолу та 0,05% Triton X-100. За допомогою піпетки у кожні пробірки додавали 1 мл розчину. Потім пробірки помістили в центрифугу на 10 хвилин.

Після того, як насіння випало на дно пробірки, надлишок рідини відбирали за допомогою піпетки.

- Друге промивання: До кожної пробірки додали 1 мл 100% етанолу. Пробірки переверталися на 5 хвилин, після чого надлишок рідини відбирали піпеткою.

- Сушіння: Пробірки розміщували горизонтально для висихання поблизу потоку повітря на стерильному робочому столі з відкритими кришками та відкритою стороною до потоку повітря. Для перевірки сухості насіння, кришку закривали і перевертали пробірки Еппендорфа. Якщо насіння вільно рухалося по всій пробірці, це означало, що воно сухе.

### 2.1 Перенесення насіння на агарові пластини.

Насіння було розсипано на 4 чашки Петрі, після чого вони були закриті повітропроникною стрічкою. Наступною дією було розміщення чашок Петрі в холодильнику (4 °C) з агаром донизу.

### 3. Підготовка тесту на солюбілізаційну активність фосфору.

Було підготовлено одну чашку Петрі з фітатом і ще одну з середовищем Піковської. За рекомендацією наукових керівників, нам надали два штами *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens* і *Pseudomonas jessenii*), які вирощували в рідкому середовищі, в скляних пробірках за день до початку.

Після чого, почали визначати оптичну щільність (OD) обох штамів. Для цього фотометр калібрували за допомогою живильного розчину LB для довжини хвилі 600 нм, для чого 1 мл розчину вносили в кювету об'ємом 1 мл.

Для того, щоб визначити оптичну щільність *Ps. fluorescens* додавали в кювету бактеріальний розчин об'ємом 1 мл. Оптична щільність

становила 0,114. Оскільки розчин *Ps. jessenii* вже мав дуже жовтий, каламутний вигляд, його розбавили у два рази, одне розведення 1:1 і одне розведення 1:3. Для розведення 1:1 в кювету вносили 0,5 мл, для розведення 1:3 - 0,25 мл бактеріального розчину. Після чого обидві кювети доповнювали LB-середовищем до загального об'єму 1 мл.

Потім почали вимірювати оптичну щільність двох бактеріальних розведень. Оскільки значення для розведення 1:1 перевищувало 1, для подальшого аналізу брали до уваги тільки розведення 1:3. Оптична щільність для розведення 1:3 становило 0,624. Перерахунок оптичної щільності вихідного розчину мав би становити 2,496. Оскільки OD для аналізу фосфатрозчинної активності має становити 0,6, *Ps. jessenii* розбавляли LB-середовищем (співвідношення Ps: LB 24:76).

Для проведення тесту заздалегідь були підготовлені чашка Петрі з фітатовмісним агаром і з середовищем Піковської (неорганічний фосфат). На середовище Піковської наносили по 3 краплі кожного розчину (*Ps. fluorescens*, *Ps. jessenii*, LB-середовище) в одну точку, в той час як на фітатне середовище для кожного розчину наносили лінію з 3 краплями. Рекомендоване значення OD бактеріальних розчинів для аналізу активності фосфатрозчинності становить 0,6. Проте *Ps. fluorescens* з OD 0,114 був нанесений на чашки Петрі. Потім наносили *Ps. jessenii* (OD 0,6), як зазначено вище. Після цього планшети запечатували параплівкою і зберігали в інкубаційній камері.

Згодом, наші керівники вирішили підготувати ще одну пластину Піковської з *Ps. fluorescens* з OD 600 0,6. Одночасно зробили 3 різні розведення *Ps. fluorescens* (1:10, 1:100, 1:1000) вносячи в чашки Петрі для росту.

### 2.3 Проведення дослідження

Тривалість експерименту складало чотири тижні. Після чого, був збір та аналіз рослинного матеріалу. Ми вимірювали такі показники для досліджених рослин:

- Вимірювання для листя: морфометричні параметри (кількість листків, маса); вміст фосфатів; вміст антоціанів.
- Вимірювання для коренів: морфологічні параметри (кількість листків, маса); вміст фосфору; вміст антоціанів; морфометричні параметри (маса)б; вміст фосфатів.
- Вимірювання для ґрунту: вміст фосфатів; рН.

**На першому тижні (16.10.2023-22.10.2023)** були відкалібровані сенсори, які мають здатність утримувати воду у горщиках з піщано-земляною сумішшю у співвідношенні 8:2. В кожному лотку один попередньо підготовлений горщик був замінений на горщик з водоутримуючим сенсором. Коригування ваги було здійснене для чорних горщиків до 800 г та для червоних горщиків до 850 г. Потім, було додано гідроксиapatит для досягнення концентрації 45 мг/кг: 36 мг додано в чорні горщики та 38 мг у червоні горщики. Після цього ґрунт поверхнево перемішали паличкою. Наступним кроком для цього тижня була перевірка старту вирощування. Але висаджування розсади не вдалося через її дрібний розмір та велику кількість піску в горщиках, які б призводили до висихання при пересадці.

Під час перевірки активності солюбілізації фосфору зафіксували наступне: обидва штами (*Ps. fluorescens* і *Ps. jessenii*) виявили ріст на середовищі Піковської, характеризується легким галом навколо культур. На фітатному середовищі було помічено 3 колонії *Ps. jessenii* та відсутність колоній під *Ps. fluorescens* та середовищем LB.

Також був описаний успішний процес проростання насіння *Arabidopsis thaliana*, але рослини залишалися дуже маленькі. Пересадка була запланована на другий тиждень.

**На другому тижні (23.10.2023-29.10.2023)** зроблено кілька важливих дій. Спочатку після поливу в кожен горщик пересадили по 4 саджанці, розташували їх у вигляді квадрата посередині горщиків. Для цього зроблено 4 отвори за допомогою пінцета, а потім розсаду перенесли з агарових пластин, кожна в одну лунку.

Також було внесено рішення щодо використання *Ps. fluorescens* як фосфатсолубілізуючої бактерії в експерименті, тому що *Ps. jessenii*, за своєю природою, є трансгенним організмом і не може бути використаний в теплиці.

Під час інокуляція *Ps. Fluorescens* одна рослина загинула в кожному горщику. Крім цього, було розведено *Ps. fluorescens* для подальшого підрахунку клітин, узгоджено з інструкцією. *Ps. fluorescens*, внесено OD 0,8 мл на кожную рослину на ґрунт поруч з рослиною.

Після цього, було підготовлено середовище R2A, а також змішано та внесено добриво Хогланда без фосфору. Це було розведено на 1 л та внесено по 50 мл на кожную рослину. Крім того, для кожної рослини було нанесено по 0,8 мл підготовленого середовища R2A.

**Третій тиждень (30.10.2023-5.11.2023)** почався з внесення добрива *Hoagland* (-P), який підготували і внесли його рослинам, як описано на другому тижні. Наступним кроком було видалення зайвих рослин, тому що рослини в горщиках були розміщені нерівномірно, через це відстань між саджанцями була різною в різних горщиках, тому рослини, що залишилися, довелося знищити. Для цього рослини виймали з горщика за допомогою пінцета, корінь кожної рослини відрізали і залишали всередині горщика, оскільки до нього прилипав субстрат.

На цьому тижні також приготували добриво вже самостійно. Це 5-кратний маточний розчин Хогланда і передбачає розведення в 5 разів. Згідно з інструкцією, ми повинні взяти 10 мл вихідного розчину і розвести його в 5 разів. Таким чином ми отримуємо 50 мл розчину для поливу рослин (в кожен горщик). Але це може вплинути на водний режим кожної

підгрупи, тому ми вирішили додати в кожен горщик по 10 мл основного розчину.

На останньому **четвертому тижні (6.11.2023-12.11.2023)**, ми рандомізували наші горщики всередині кожної підгрупи. Для цього ми використовували Excel та генератор випадкових чисел. Новий рандомізований розподіл наведено у таблиці 2.1

Таким чином, ми рандомізували горщики в кожен підгрупу. Але нам потрібно рандомізувати лотки. Для цього нам потрібно перепрограмувати FarmBot, адже він запрограмований поливати наші рослини саме в такому порядку, в якому були раніше. Ми підготували нову схему поливу для впорядкування лотків:

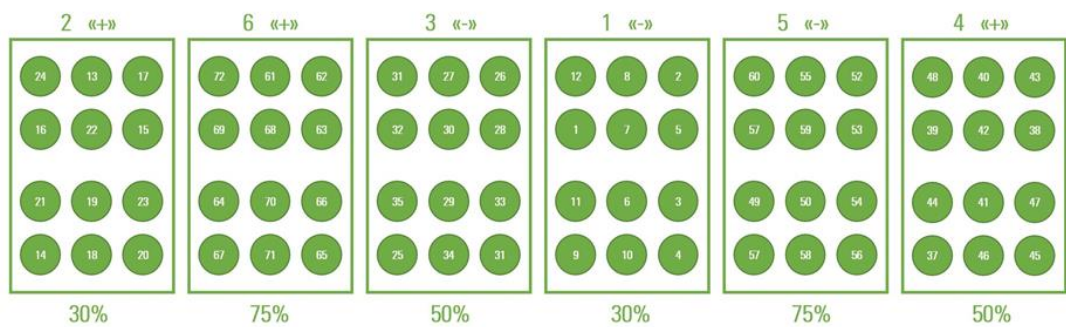
Також ми підготували новий розчин добрива для поливу рослин (згідно з відомим рецептом) та підраховали кількість КУО для *Ps. fluorescens* згідно з протоколом.

Таблиця 2.1

### Рандомізування горщиків всередині кожної підгрупи

Лотки											
1		2		3		4		5		6	
До	Післ	До	Післ	До	Післ	До	Післ	До	Післ	До	Післ
о	я	о	я	о	я	о	я	о	я	о	я
1	4	1 3	20	25	31	3 7	42	4 9	56	61	70
2	3	1 4	23	26	33	3 8	43	5 0	54	62	68
3	10	1 5	18	27	34	3 9	47	5 1	58	63	67
4	6	1 6	19	28	29	4 0	38	5 2	50	64	66
5	9	1 7	14	29	25	4 1	44	5 3	51	65	61

6	11	1 8	21	30	35	4 2	45	5 4	49	66	62
7	5	1 9	15	31	28	4 3	41	5 5	53	67	65
8	2	2 0	17	32	26	4 4	37	5 6	52	68	69
9	7	2 1	22	33	30	4 5	39	5 7	59	69	71
1 0	8	2 2	13	34	27	4 6	40	5 8	55	70	64
1 1	1	2 3	16	35	32	4 7	46	5 9	57	71	63



**Рис. 2.2** Схема рандомізування лотків.

І отримуємо наступний результат:

- 1) За формулою ми порахували кількість КУО/мл для  $OD_{600}=0,1$
- 2) Для бактеризації рослин ми використали  $OD_{600}=0,4$ . Для цього ми помножили значення в 4 рази.

3) Ми використовували 0,8 мл бактеріальної суспензії для інокуляції, тому може бути добре, якщо ми помножимо значення в 0,8 рази - результат описує кількість КУО, яку ми використовували для бактеризації. Але для різних розведень ми отримали різні результати. Так, для  $DF=8 \cdot 10^6$  кількість становить  $1,43 \cdot 10^9$  КУО. Тоді як для  $DF=8 \cdot 10^5$  кількість  $KYO=2 \cdot 10^8$ , а для  $DF=8 \cdot 10^4$  -  $1,23 \cdot 10^8$ .

**П'ятий тиждень (13.11.2023 - 19.11.2023)**, Рослини були доставлені з теплиці в лабораторію, де аналіз проводився в наступному порядку:

першим етапом був підрахунок листків кожної рослини, які ми відмічали в таблиці Google Docs "дані\_рослини". Далі, зрізання надземної частини (стебла та листя). Щоб зберегти рослини у вологому стані, ми розміщали кожен рослин на серветці з п'ятьма іншими рослинами, позначеними відповідно до номера горщика. Після чого зважували пагони, відмічаючи в таблиці Google Docs "дані\_рослини".

Далі йшла підготовка пробірок Еппендорф для аналізу фосфору та антоціану листків, для цього нам потрібно було:

- нумерувати еппендорфи від 1 до 72 + 6 еппендорфів для стандартної кривої (один раз для аналізу фосфору та один раз для аналізу антоціану);
- відібрати та зрізати найбільші листки;
- для аналізу фосфору: 20-50 мг рослинного матеріалу зважували та поміщали в еппендорф відповідно до номера рослини, точну вагу зазначали в таблиці Google Docs "дані\_рослини";
- для аналізу антоціанів: приблизно 20 мг рослинного матеріалу зважували та поміщали в еппендорф відповідно до номера рослини, точну вагу записували в таблицю Google Docs "дані\_рослини".
- Другим етапом було виймання коренів з горщиків. Через дуже тонке коріння *A. thaliana* було дуже складно виймати його цілим. Тому що, треба було ретельно перебирати ґрунт у пошуках коренів. Після цього коріння промивали дистильованою водою, які після поміщали на серветку, промарковану номером горщика, збризнувши водою і зверху накладали ще одну серветку, щоб зберегти коріння вологими.

Ґрунт (після виймання коренів) поміщали в один лоток для кожної групи з 12 рослин. Для цього треба було зібрати по 500 г матеріалу з 6



різних місць в один поліетиленовий пакет, який потім ретельно перемішували та заморожували при температурі  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Після закінчення процедури з вийманням коренів та підготовки ґрунту для послідуєчих аналізів, ми розпочали підготовку пробірок Еппендорфа для аналізу вмісту фосфору в коренях, для цього ми зробили:

- нумерацію еппендорфів від 1 - 72 + 6 еппіс для стандартної кривої
- коріння розміщували відповідно до номера горщика в еппендорфі для цього кожен корінь зважували і відмічали вагу в таблиці Google Docs "дані\_рослини"

Для експерименту, ми також повинні були сканувати коріння за допомогою WinRhizo, але не стали, оскільки частина кореневого матеріалу також була втрачена в процесі виймання їх з ґрунту.

Після того, як ми повністю зібрали врожай та підготували всі матеріали для проведення аналізів, ми розпочали їх виконувати. Та розпочали ми з аналізу на вміст фосфору в листях *A. thaliana* за таким сценарієм:

- Для подрібнення заморожених листків використовували TissueLyser III.
- Потім до кожної чашки Еппендорфа додавали 300  $\mu\text{l}$  3%  $\text{HClO}_4$  і центрифугували при 14 000 об/хв протягом 5 хвилин.
- Надосадову рідину об'ємом 120  $\mu\text{l}$  переносили на планшет TECAN, додавши 80  $\mu\text{l}$  реагенту молібдату амонію, інкубували протягом 10 хвилин. Для визначення кількості фосфатів отримані значення порівнювали зі стандартними серіями.

Для приготування стандартної серії реагенти змішували згідно з таблицею 2.2 нижче в 6 пробірках Еппендорфа. Потім 120  $\mu\text{l}$  кожного розчину переносили на планшет TECAN, додавали 80  $\mu\text{l}$  реагенту

молібдату амонію та інкубували протягом 10 хвилин. Поглинання вимірювали при 720 нм.

Таблиця 2.2

### Реагенти для стандартної серії

Розчин	HClO <sub>4</sub>	0,01M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Кінцевий обсяг
0 nmol	600 µl	0 µl	600 µl
10 nmol	595 µl	5 µl	600 µl
20 nmol	590 µl	10 µl	600 µl
30 nmol	585 µl	15 µl	600 µl
40 nmol	580 µl	20 µl	600 µl
50 nmol	575 µl	25 µl	600 µl

Для аналізу вмісту фосфатів у коренях використовувався той самий протокол, що і для листя. Для аналізу антоціанів нам знадобилось приблизно 20 мг рослинного матеріалу (листя), який збирали та зважували на аналітичних вагах. Потім поміщали в заздалегідь підготовлені та промарковані пробірки Еппендорфа відповідно до номера рослини. Зразки заморожували в рідкому азоті та зберігали в криокамері при температурі -72,5°C, аналіз проводили наступного дня. Заморожені зразки подрібнювали за допомогою TissueLyser III. Однак, через початковий неправильний вибір швидкості та тривалості подрібнення, а також великий розмір металеві кульки в пробірці Еппендорфа, деякі пробірки Еппендорфа були пошкоджені. Ці пошкоджені пробірки позначені в таблиці 2.3 фіолетовим кольором. Для подальшого аналізу на вміст фосфору ґрунту, матеріал помістили на добу в сухожарову шафу при температурі 65 °C для просушування. На слідуючий день було розпочато роботу над аналізом ґрунту на вміст фосфору. Для цього аналізу потрібно просіяти через сито 50 г висушеного ґрунту, потім з просіяного зразка 3 порції по 5 г помістити в 3 пластикові банки.

Таблиця 2.3

### Пробірки Еппендорфа для аналізу антоціанів

30 % ВУЗ «-»	30% ВУЗ «+»	50% ВУЗ «-»	50% ВУЗ «+»	75% ВУЗ «-»	75% ВУЗ «+»
2	13	26	37	50	64
3	15	28	40	53	65
6	17	29	41	54	66
7	20	32	42	55	71
8	22	34	46	57	72
9		35	47	60	
12			48		

У кожному банку додавали 100 мл дистильованої води, інтенсивно струшували протягом 5 хвилин і фільтрували через фільтрувальний папір у мірний циліндр. По 5 мл кожного відфільтрованого зразка переносили в окремі пробірки, промарковані 1, 2 і 3. По 5 мл розчину з кожної відфільтрованої проби змішували для контролю. Ці 5 мл суміші помістили в окрему пробірку, позначену "контроль". У кожному пробірці, крім контролю, додавали по 6 крапель реактиву PO4 -1 з набору Visocolor, ретельно перемішували, після чого додавали по 6 крапель реагенту PO4-2. Пробірки поміщали на водяну баню при 80°C на 4 хвилини, а потім охолоджували під проточною водою. Вимірювання проводили за допомогою спектрофотометра, запрограмованого на 5849, для обнулення використовували контрольний зразок.

Одразу після аналізування фосфору в ґрунті, ми розпочали аналізувати рН. Для визначення рН:

- відфільтрований розчин з попереднього експерименту переносили з циліндра в мірний стакан і поміщали на магнітну мішалку;
- за допомогою рН-метра вимірювали рН розчину;

- після цього рН-метр промивали дистильованою водою перед тим, як використовувати його для вимірювання наступної проби.

## РОЗДІЛ 3.

### ВПЛИВ ФОСФАТРОЗЧИННИХ БАКТЕРІЙ НА ЗАСВОЄННЯ ФОСФОРУ РОСЛИНАМИ

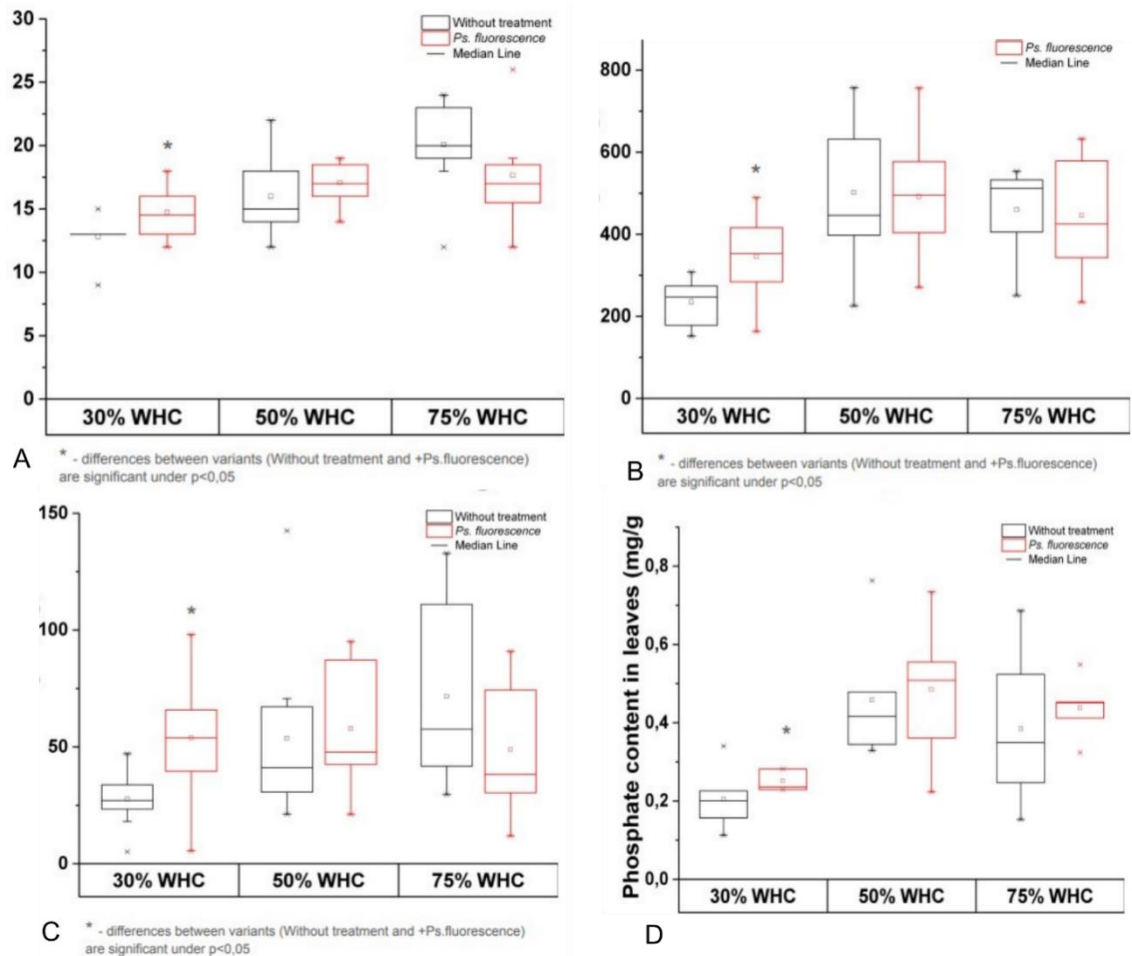
#### 3.1 Статистичний аналіз отриманих експериментальних результатів

Для статистичної оцінки експериментальних результатів, ми використали такі статистичні методи:

- Перевірка даних на нормальний розподіл (тест Шапіро-Уїлка)
- Оскільки наші дані мають невелику кількість вибірок, ми використали тест Манна-Уїтні. Для додаткової перевірки на нормальний розподіл ми використовували ANOVA, а для непараметричного розподілу - KW-тест.
- Ми перевірили підозрілі дані на випадання з розподілу. Але жодні дані ми не виключали з жодного розподілу.
- Для визначення впливу бактерізації на кількісний параметр (рН ґрунту) ми використовували точкову бісеріальну кореляцію.

Перші результати були з підрахунку листів *Arabidopsis thaliana*. Загалом, в одному горшку з позначкою 30% та 75% водоутримуючої здатності без додавання *Pseudomonas fluorescense*, були всі дрібні молоді листки, які не були враховані та виключені з подальших дослідженнях. Відповідно до отриманих результатів, у рослинах з позначкою 30% водоутримуючої здатності без додавання бактерії, кількість листів коливається з 9-15, а у рослин з додаванням бактерії починаючи від 12-18. У рослин з позначкою 50% водоутримуючої здатності без додавання

бактерії, кількість листів коливається з 13-22, з додаванням бактерії починаючи від 14-19.

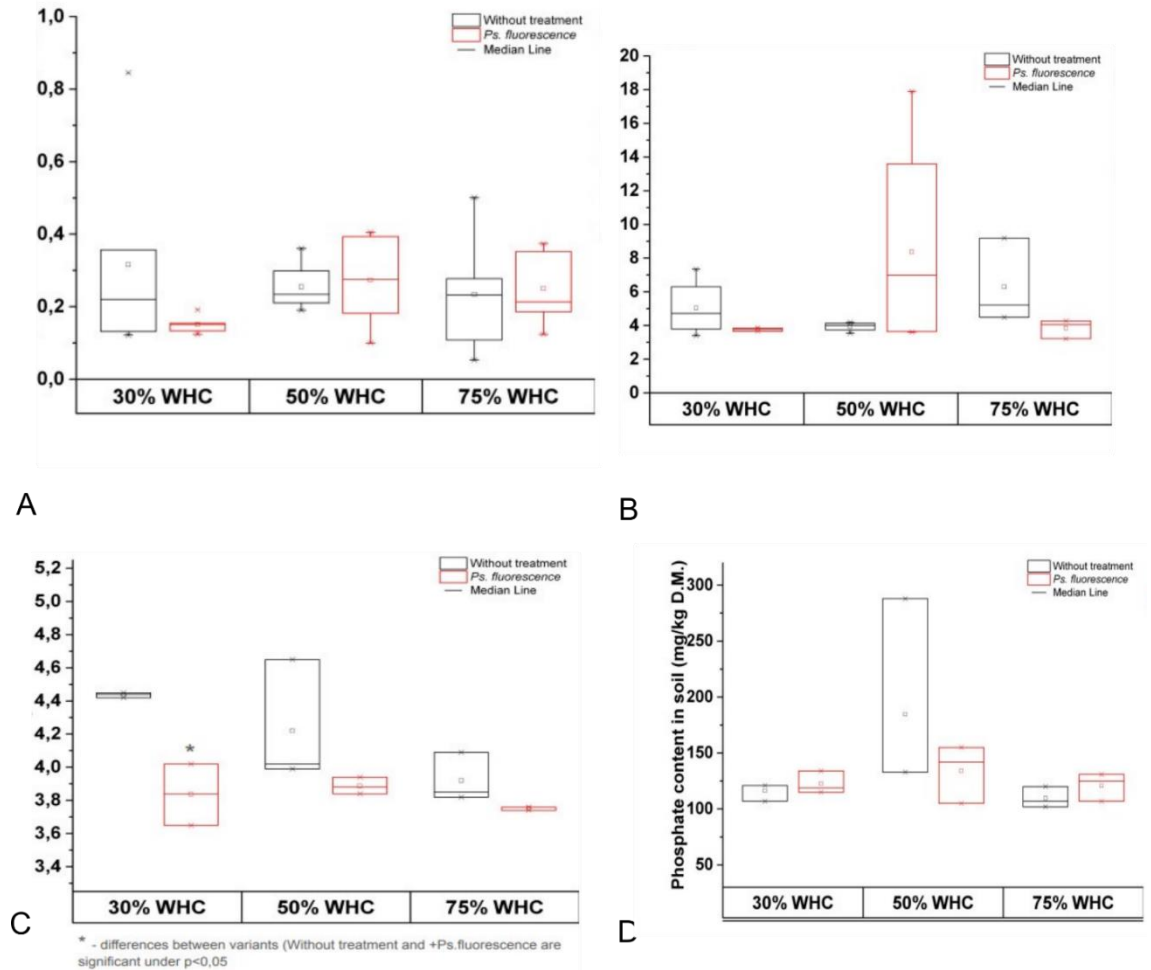


**Рис. 3.1 А - Кількість листків; В - Маса пагонів; С - Маса коренів ; D – Вміст фосфатів у пагонах.**

У рослин з позначкою 75% водоутримуючої здатності без додавання бактерії кількість листків коливається з 12-24, з додаванням бактерії починаючи від 12-25 листків (Рис. 3.1). Манна-Уїтні-критерій дозволив визначити значущих різниць у кількості листків 30 % водоутримуючої здатності + додавання *Ps. fluorescens*.

Значна різниця була відмічена для варіанту експерименту з 30% водоутримуючої здатності, а саме зафіксовано значне збільшення маси пагонів в рослинах з додаванням *Ps. fluorescens*. У той же час, не було зафіксовано значної різниці у масі пагонів для варіантів 50% та 75% водоутримуючої здатності. Це може бути пов'язано з більшою кількістю

вологи, яку отримує рослина у такому варіанті експерименту та відповідно нівелюванням впливу фосфоророзчинної бактерії на ріст біомаси.



**Рис. 3.2 А - Вміст фосфатів в коренях; В - Відносна концентрація антоціану в листі; С - рН ґрунту; D – Вміст фосфатів в ґрунті.**

Дослідження маси коренів дозволили виявити значні статистичні відмінності у межах 30% групи водоутримуючої здатності (за Манна-Уїтні тестом). Також варто зазначити, що отримані результати можуть мати значну похибку через те, що у рослин були дуже тонкі корені та витягавши їх з ґрунту, можливі були пошкодження та руйнування частини коренів.

Манна-Уїтні тест дозволив виявити значну різницю у вмісті фосфатів у пагонах досліджених рослин у групі 30% водоутримуючої здатності. Механізм ексудації органічних кислот *A. thaliana* точно не відомий, але ми припускаємо, що органічні кислоти / фосфатази (*Ps.fluorescens*): допомагають вивільнити Р з нерозчинних сполук у ґрунті. Лимонна кислота / глюконова кислота: хелатні агенти, зв'язують катіони металів у ґрунті, вивільняючи фосфат-іони з нерозчинних сполук.

Манна-Уїтні тест не виявив статистично достовірних результатів у вмісті фосфору у коредях досліджених об'єктів. Можна припустити, що це пов'язано з активним транспортом фосфат-іонів до пагона через більш інтенсивні метаболічні процеси в ньому.

рН ґрунту статистично не мав відмінностей відповідно до Манна-Уїтні-тесту (Рис. 3.2), проте візуальна оцінка розподілу показує наявність певної тенденції між групами без бактерій і з бактеріями. Тому, було прийнято рішення провести додаткове тестування (Таблиця 3.1):

1) Згідно з літературними джерелами, ФРБ можуть виділяти деякі органічні кислоти, які знижують рН ґрунту. Отже, виходячи з цього факту, ми можемо уточнити нашу статистичну гіпотезу. Наприклад, ми припустимо, що за допомогою правостороннього U-критерію (група 1 більша за групу 2).

2) Ми можемо використати стандартний ANOVA-тест для нормального розподілу та KW-тест для непараметричних розподілів.

3) У такому випадку краще розрахувати кореляцію між кількісними параметрами (рН ґрунту) та якісним фактором (наявність/відсутність бактерій).

Додаткові статистичні тести дозволили виявити статистично значущі відмінності у рівні рН ґрунту між підгрупами у варіанті 30% водоутримуючої здатності є значущими.



Результати порівняння вмісту фосфору у ґрунті для досліджених варіантів за тестом Манна-Уїтні також не виявив суттєвих відмінностей між окремими групами з бактеріями та без них.

Таблиця 3.1

## Результати додаткового тестування рН ґрунту

<b>Водоутримуюча здатність</b>	<b>U-тест правосторонній</b>	<b>P-значення</b>	<b>Результат</b>
30%	9,0	0,040	Значна різниця
50%	9,0	0,040	Значна різниця
75%	9,0	0,038	Значна різниця
<b>Водоутримуюча здатність</b>	<b>F-тест (ANOVA)</b>	<b>P-значення</b>	<b>Результат</b>
30%	31,335	0,005	Значна різниця
50%	2,36	0,199	Незначна різниця
<b>Водоутримуюча здатність</b>	<b>KW-тест (H)</b>	<b>P-значення</b>	<b>Результат</b>
75%	3,97	0,046	Значна різниця
<b>Водоутримуюча здатність</b>	<b>Бісеріальний коефіцієнт кореляції</b>	<b>Результат</b>	
30%	-0,94*	Значна кореляція	

50%	-0,61	Незначна кореляція
75%	-0,70	Незначна кореляція

\*- достовірно при  $p < 0,05$ .

### 3.2 Відповідність отриманих даних до літературних джерел та їх обговорення

В дослідженні «Реакція модельної рослини *Arabidopsis thaliana* на ризобактерії, що сприяють росту рослин, і концентрацію фосфату», було виявлено, що присутність *Pseudomonas fluorescens* впливає на кількість фосфату в рослинах. Конкретно, автори спотерігали, що ця ризобактерія спричиняє значне збільшення вмісту фосфату в рослинах у порівнянні з умовами без її присутності. Також виявлено, що у наявності *Pseudomonas fluorescens* спричиняє збільшення всіх рівнів фосфатів, які були досліджені. Ці результати свідчать про те, що ці бактерії допомагають збільшити кількість розчинених фосфатів у системі коренів рослин. Механізм, яким це досягається, поки не повністю зрозумілий, проте можливо, що це пов'язано із виробництвом специфічних речовин, що полегшують доступність фосфатів для поглинання рослиною [15]. Під час проведеного експерименту також було зафіксовано збільшення рівня фосфатів у вегетативних частинах дослідних рослин, що цілком відповідає попереднім дослідженням.

Дослідження Oberhänsli (1991) було зосереджено на *Ps. fluorescens* та його біологічно активні речовини, які можуть активувати реакцію ауксину, особливо впливаючи на початок і розширення листків. *Ps. fluorescens* відомий тим, що виробляє натуральні продукти з протигрибковою дією та відіграє роль у біологічному контролі патогенів та стимулюванні росту рослин. Дослідження підкреслило значення *Ps. fluorescens* у модулюванні відповіді ауксину, що є вирішальним для процесів, таких як ініціація листя та розширення в рослинах. Ця взаємодія підкреслює складні відносини між мікроорганізмами, такими як *Ps.*

*fluorescens* і розвиток рослин, проливаючи світло на роль корисних бактерій у фізіології рослин [19].

Yasmin та ін. у 2022 році провів дослідження, у якому штами *Pseudomonas*, виділені з кукурудзи та рису, були інокуловані в *Arabidopsis thaliana*, що призвело до індукованої посухостійкості та подальшого збільшення біомаси. Це дослідження підкреслює потенціал конкретних штамів *Pseudomonas*, виділених з різних рослинних джерел, для підвищення стійкості рослин до посухового стресу та сприяння виробництву біомаси [31]. Отримані нами дані також вказують на важливість корисних мікроорганізмів, таких як *Pseudomonas*, у покращенні адаптації рослин до складних умов навколишнього середовища, таких як посуха, що в кінцевому підсумку сприяє покращенню росту та продуктивності рослин.

Дж. Зіа та співавтори у своїй роботі досліджували використання мікробіому для створення рослин, які витримують посушливі умови. Автори обговорюють, як рослини можуть формувати свій мікробіом ризосфери та як це може впливати на їх толерантність до стресу від посухи [35]. Також розглядаються різні підходи та стратегії, які можуть бути використані для маніпулювання мікробіомом ризосфери з метою підвищення врожайності в умовах посушливої кліматичної зони. У цьому дослідженні підсумовано вплив засухи на ріст та продуктивність рослин, викликаний дисбалансом у живленні та гормональному фоні. Незважаючи на наявність багатьох стратегій для підвищення стійкості рослин до посухи, молекулярні механізми взаємодії рослин та мікробіому залишаються малодослідженими. Мікробіом, відомий як "другий геном" рослин, визначає їх здоров'я. Сучасні дослідження взаємодії рослин та мікроорганізмів показали, що рослини можуть впливати на мікробіом ризосфери, що проявляється у формуванні специфічних мікробних спільнот при рості на одному ґрунті. Глибше розуміння взаємодії корисних бактерій ризосфери з рослиною дозволить краще

використовувати мікроорганізми на користь рослин. Цей огляд відкриває нові можливості у збалансованому підході до управління стресом від посухи в рослинництві. В залежності від типу ґрунту, інтенсивності посухи та кліматичних умов можна адаптувати різні підходи шляхом впливу на мікробіом ризосфери, внесення органічних та поживних речовин, фітогормонів, додавання рідких наноглин і наночастинок, а також раціональне водокористування для отримання врожаю без жертвування продуктивності. Зображення геному може сприяти створенню посухостійких культур, але більшість досліджень ще потребують подальшої перевірки на полі. Додаткові дослідження біохімічних та фізіологічних аспектів стресу відкриють нові можливості для подолання проблеми продовольчої безпеки. Необхідно провести спільні дослідження для ідентифікації корисних мікроорганізмів для стійкості до посушливих умов та вирішення питань постачання та польової оцінки потенційних організмів [50].

Стаття «Штам *Bacillus subtilis* GOT9 забезпечує підвищену стійкість до посухи та сольового стресу у *Arabidopsis thaliana* та *Brassica campestris*», досліджує вплив ризобактерій *Bacillus subtilis* GOT9 на підвищення посухостійкості та стійкості до солі у рослин, зокрема у *Arabidopsis thaliana* та *Brassica campestris*. Дослідження показало, що під впливом штаму *B. subtilis* GOT9 ці рослини мали поліпшену толерантність до посухи та соляного стресу. Ризобактерії, що стимулюють ріст рослин, можуть забезпечувати підвищення стійкості рослин до стресових умов, активуючи ряд генів, які реагують на стрес, та сприяючи накопиченню осмолітів. Результати дослідження підкреслюють важливість використання ризобактерій, що стимулюють ріст рослин, зокрема *B. subtilis* GOT9, для поліпшення урожайності та стійкості важливих сільськогосподарських культур до негативних впливів посухи та солі [29].

Результати дослідження Luo та ін. показали, що ризобактерії, що сприяють росту рослин, а саме *Sphingomonas* sp. Cra20 має вплив на морфологічні та фізіологічні властивості арабідопсису, сприяє утворенню листків та вплив на розвиток структури кореневої системи, підвищуючи водопоглинальну здатність та пом'якшуючи стрес від посухи. Рослини, які демонстрували швидший темп розвитку, були більшими, але репродуктивний період не скорочувався. Крім того, інокуляція Cra20 змінила місцеву бактеріальну спільноту ризосфери. Цікаво, що деякі з бактеріальних таксономічних одиниць з найбільш значними змінами у відносній чисельності показали здатність стимулювати ріст рослин в інших дослідженнях. Цей ефект сприяння росту сприятиме розвитку сільського господарства в суворих умовах. Крім того, дані про те, що інокуляція прискорює ріст, не впливаючи на вегетаційний період, можуть бути новими особливостями взаємодії між рослинами та бактеріями [14].

## ВИСНОВКИ

1. Всебічний аналіз літературних джерел дозволив становити механізми взаємодії фосфатрозчинних бактерій з рослинами та показав значну роль цих мікроорганізмів у засвоєнні фосфору рослинами. Огляд джерел також вказує на потенційну роль цих бактерій в механізмах адаптації рослин до несприятливих умов навколишнього середовища, а саме недостатньої вологості та засолення ґрунтів.

2. Під час дослідження сформульована структурована схема експерименту з визначення впливу *Pseudomonas fluorescens* на *Arabidopsis thaliana* в умовах різного рівня вологості ґрунту. Експериментальні дослідження були проведені на базі Кельнського університету, а отримані навички та схеми дослідження можуть бути використані під час підготовки здобувачів у Херсонського державного університету.

3. Експеримент показав значний вплив фосфатрозчинних бактерій на засвоєння фосфору рослинами. Це підтверджує важливість вивчення взаємодії між мікроорганізмами та рослинами для покращення росту та врожайності. Наявні відмінності в масі пагонів та водоутримуючої здатності рослин є індикатором впливу бактерій на розвиток рослинних систем.

4. Ефективність використання конкретних штамів бактерій, виділених з ризосфери різних рослин, для підвищення посухостійкості рослин вказує на потенційну можливість використання цих бактерій у сільському господарстві. У цілому, результати дослідження вказують на істотний вплив фосфатрозчинних бактерій на рослинний розвиток та підкреслюють важливість та актуальність подібних експериментів досліджень.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Chi, J. L., Hao, M., Wang, Z. X., Li, Y. Advances in research and application of phosphorus-solubilizing microorganism. *Microbiology*. 2021. Vol. 41, No 1. P. 17.
2. De Weert S., Vermeiren H., Mulders I., Kuiper I., et al. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2002. Vol. 15. P. 1173-1180. doi: 10.1094/MPMI.2002.15.11.1173
3. Djuuna I. A. F., Prabawardani S., Massora M. Population distribution of phosphate-solubilizing microorganisms in agricultural soil. *Microbes Environ.* 2022. Vol. 37. P. ME21041. doi: 10.1264/jsme2.ME21041
4. Ducouso-Détrez A., Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A., Hijri M. Diversity of phosphate chemical forms in soils and their contributions on soil microbial community structure changes. *Microorganisms*. 2022. Vol. 10. P. 609. doi: 10.3390/microorganisms10030609
5. Etesami H., Jeong B., Glick B. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing bacteria, and silicon to P uptake by plant. *Front. Plant Sci.* 2021. Vol. 12. P. 699618. doi: 10.3389/fpls.2021.699618
6. Gómez-Godínez L. J., Aguirre-Noyola J. L., Martínez-Romero E., Arteaga-Garibay R. I., et al. Look at plant-growth-promoting bacteria. *Plants*. 2023. Vol. 12. P. 1668. doi: 10.3390/plants12081668
7. He Z. D., Gao Y. F., Wang Y., Li C.X., et al. Study on the selection of phosphate-solubilizing rhizobacteria strains that stimulate plant growth and its effect on tomato growth promotion. *Southwest China J. Agric. Sci.* 2020. Vol. 33. P. 2891-2896.
8. Hu H., He J., Li X., Liu F. Effect of several organic acids on phosphate adsorption by variable charge soils of central China. *Environ Int.* 2001. Vol. 26. P. 353-358. doi: 10.1016/S0160-4120(01)00012-5

9. Khourchi S., Elhaisoufi W., Loum M., Ibnyasser A., et al. Phosphate solubilizing bacteria can significantly contribute to enhance P availability from polyphosphates and their use efficiency in wheat. *Microbiol. Res.* 2022. Vol. 262. P. 127094. doi: 10.1016/j.micres.2022.127094
10. Kiprotich K., Muoma J., Omayio O D., Ndombi S T., et al. Molecular characterization and mineralizing potential of phosphorus solubilizing bacteria colonizing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizosphere in Western Kenya. *Int J Microbiol.* 2023. Vol. 1. P. 6668097. doi: 10.1155/2023/6668097
11. Li G., Wu X., Ye J., Yang H. Characteristics of Organic Acid Secretion Associated with the Interaction between *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 and Poplar Root System. *Biomed Res. Int.* 2018. P. 9619724. doi: 10.1155/2018/9619724
12. Liang J., Liu J., Jia P., Yang T., et al. Novel phosphate-solubilizing bacteria enhance soil phosphorus cycling following ecological restoration of land degraded by mining. *ISME J.* 2020. Vol. 14. P. 1600-1613. doi: 10.1038/s41396-020-0632-4
13. Liu C.J., Du C.Y., Liang Z.J., Xia Z.J., et al. Identification of a highly effective phosphate-soluble strain CT45-1 and its stimulant effect on tobacco. *Shandong Agric. Sci.* 2019. Vol. 51. P. 74-78.
14. Luo Y., Wang F., Huang Y., Zhou M., et al. *Sphingomonas* sp. Cra20 Increases plant growth rate and alters rhizosphere microbial community structure of *Arabidopsis thaliana* under drought stress. *Front Microbiol.* 2019. Vol. 10. P.1221. doi: 10.3389/fmicb.2019.01221
15. Mashkoo Abdulhusein S., Kisko Karomi F. M. Response of model plant *Arabidopsis thaliana* to Plant growth promoting rhizobacteria and phosphate concentration. *Biotechnol. Journal of Physics: Conference Series.* 2021. Vol. 1879. P. 022042. doi 10.1088/1742-6596/1879/2/022042
16. Massucato L., Almeida S., Silva M., Mosela M., et al. Efficiency of combining strains Ag87 (*Bacillus megaterium*) and Ag94 (*Lysinibacillus*



sp.) as phosphate solubilizers and growth promoters in maize. *Microorganisms*. 2020. Vol. 10. P. 1401. doi: 10.3390/microorganisms10071401

17. Mei XL, Shan AQ, Jiang Y., Wei Z., et al. Screening of phosphorus-soluble bacteria adapted to maize and their impact on maize growth. *Acta Pedologica Sinica*. 2016. Vol. 53. P. 502-509.

18. Neal A., Blackwell M., Akkari E., Guyomar C., et al. Phylogenetic distribution, biogeography, and the effects of land management upon bacterial non-specific acid phosphatase gene diversity and abundance. *Plant Soil*. 2018. Vol. 427. P. 175-189. doi: 10.1007/s11104-017-3301-2.

19. Oberhänsli T., Dfago G., Haas D. Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *J Gen Microbiol*. 2022. Vol. 137, No 10. P. 2273- 9. doi: 10.1099/00221287-137-10-2273

20. Pan L., Cai B. Phosphate-Solubilizing Bacteria: Advances in Their Physiology, Molecular Mechanisms and Microbial Community Effects. *Microorganisms*. 2023. Vol. 11, No 12. P. 2904. doi: 10.3390/microorganisms11122904

21. Qin L. J., Wang Z. H., Chen Q. B., Bai C. J. Effect of inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and soil acidification on the growth of *Stylosanthes guianensis* Reyan No. 2. *Cao Ye Xue Bao*. 2008. Vol. 17. P. 20-28.

22. Rong G. Q., Qin X. K., Yao Q. J., Zhang Z. Q., et al. Research on application status of soil phosphate solubilizing bacteria in modern agriculture. *Farm Prod. Process*. 2021. Vol. 13. P. 86-89.

23. Sahu S., Rajbonshi M., Gujre N., Gupta M., et al. Bacterial strains found in the soils of a municipal solid waste dumping site facilitated phosphate solubilization along with cadmium remediation. *Chemosphere*. 2020. Vol. 287. P. 132320. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.132320.

24. Tang A., Haruna A., Majid N., Jalloh M. Potential PGPR properties of cellulolytic, nitrogen-fixing, phosphate-solubilizing bacteria in

rehabilitated tropical forest soil. *Microorganisms*. 2020. Vol. 8. P. 442. doi: 10.3390/microorganisms8030442

25. Tian J., Kuang X., Tang M., Chen X., et al. Biochar application under low phosphorus input promotes soil organic phosphorus mineralization by shifting bacterial phoD gene community composition. *Sci. Total Environ.* 2021. Vol. 779. P. 146556. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146556

26. Timofeeva A., Galyamova M., Sedykh S. Prospects for Using Phosphate-Solubilizing Microorganisms as Natural Fertilizers in Agriculture. *Plants (Basel)*. 2022. Vol. 15, No 11(16). P. 2119. doi: 10.3390/plants11162119.

27. Udaondo Z., Duque E., Daddaoua A., Caselles C., et al. Developing robust protein analysis profiles to identify bacterial acid phosphatases in genomes and metagenomic libraries. *Environ. Microbiology*. 2020. Vol. 22. P. 3561-3571. doi: 10.1111/1462-2920.15138

28. Wang C., Pan G., Lu X., Qi W. Phosphorus solubilizing microorganisms: potential promoters of agricultural and environmental engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023. Vol. 11. P. 1181078. doi: 10.3389/fbioe.2023.1181078

29. Woo O. G., Kim H., Kim J. S., Keum Lim H., et al. *Bacillus subtilis* strain GOT9 confers enhanced tolerance to drought and salt stresses in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica campestris*. *Plant Physiol Biochem*. 2020. Vol. 148. P. 359-367. doi: 10.1016/j.plaphy.2020.01.032

30. Xie J., Yan Z., Wang G., Xue W., et al. Bacterium isolated from soil in a karst rocky desertification region has efficient phosphate-solubilizing and plant growth-promoting ability. *Front. Microbiol.* 2021. Vol. 11. P. 625450. doi: 10.3389/fmicb.2020.625450

31. Yasmin H., Bano A., Wilson L N., Nosheen A., et al. Drought-tolerant *Pseudomonas* sp. showed differential expression of stress-responsive genes and induced drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant*. 2022. Vol. 174, No 1. P. e13497. doi: 10.1111/ppl.13497

32. Zhang Y., Gao W., Ma L., Luan H., et al. Long-term partial substitution of chemical fertilizer by organic amendments influences soil microbial functional diversity of phosphorus cycling and improves phosphorus availability in greenhouse vegetable production. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2023. Vol. 341. P.108193. doi: 10.1016/j.agee.2022.108193
33. Zhao X. R., Lin Q. M., Li B. G. The relationship between rock phosphate solubilization and pH and organic acid production of microorganisms. *J. Microbiol.* 2003. Vol. 23. P. 5-7.
34. Zheng B., Zhang D., Wang Y., Hao X., et al. Responses to soil pH gradients of inorganic phosphate solubilizing bacteria community. *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9. P. 25. doi: 10.1038/s41598-018-37003-w
35. Zia R., Nawaz Shoib M., Siddique Jawad M., Hakim S., et al. Plant survival under drought stress: Implications, adaptive responses, and integrated rhizosphere management strategy for stress mitigation. *Microbiol Res.* 2021. Vol. 242. P. 126626. doi: 10.1016/j.micres.2020.126626