



Original researches

Optimization of the Micromycete Cultivation Process – Basics of Growth Regulators and Biotesting Their Growth-Stimulating Activity Concerning to *Miscanthus Giganteus*

Received: 21 January 2021
Revised: 01 February 2021
Accepted: 02 February 2021

National University of Life and Environmental
Sciences of Ukraine, Heroiv Oborony Str., 13,
Kyiv, 03041, Ukraine

Tel.: +38-096-425-35-40
E-mail: veraboro@gmail.com

Cite this article: Medkov, A. I.,
Stefanovska, T. R., & Borodai, V. V. (2021).
Optimization of the micromycete cultivation
process - basics of growth regulators and
biotesting their growth-stimulating activity
concerning to *Miscanthus giganteus* *Agrology*,
4(1), 40–46. doi: 10.32819/021005

A. I. Medkov, T. R. Stefanovska, V. V. Borodai
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Abstract. *Miscanthus × giganteus* Greef et Deu. is a perennial herbaceous introduced energy hybrid plant whose biomass is used after processing to a solid or liquid biofuel. The plant is characterized by a relatively low level of absorption of pollutants from the soil by vegetative organs, as its well-developed root system acts as a buffer, helps to stabilize pollutants in the soil and prevents their further spread. Sustainable *Miscanthus × giganteus* Greef et Deu. (*M. × giganteus*) growth on contaminated with heavy metals and other xenobiotics soil depends on its adaptive performance, including establishment rate, resistance to stressors. The one way to address this issue is the use of plant growth regulators (PGRs), namely Stimpo and Regoplant with micromycete *Cylindrocarpon obtusiusculum* (Sacc.) U. Braun, whose metabolites are the active substance. The objective of this laboratory study was to evaluate possibility to cultivate *Cylindrocarpon obtusiusculum* on Chapek's medium with replacing of hydrocarbon component glucose to chipper one – lactose or starch for further production of Stimpo and Regoplant and testing its growth stimulating activity on *M. giganteus*. The results showed that the most suitable for the growth and accumulation of biomass of *C. obtusiusculum* was the Chapek media, which includes starch. The mean growth rate of *C. obtusiusculum* was in 2.3-fold higher on 8th day of cultivation compared to growth on glucose medium and in 3.3-fold higher than growth on lactose medium. It was found that on the 6th day of growth the concentration of biomass accumulated by the strain was higher on the medium with a single carbon source – starch with value of 2.47 g/l, respectively. On the Chapek medium with glucose and lactose, the biomass concentration was twice as low. Obtained results indicated the possibility of replacing glucose – a valuable carbon sources of Chapek's medium with starch as a cheaper ingredient for PGRs production. Cultivation of *C. obtusiusculum* with a change in carbohydrate source did not affect the morphological characteristics and development of spore-bearing cultures. On the medium with starch the growth acceleration and formation of mycelial fungal metabolites was observed, which were used further to obtain of the culture fluid and PGRs Stimpo and Regoplant. Their growth – stimulating activity against giant miscanthus was revealed, namely the positive influence on the indicators of *Miscanthus* establishment and growth rate. The statistical analysis conformed that source of carbon and type of PGRs effect the length of roots and aerial part of *Miscanthus* sprouts ($R_{adj}^2 = 0.91$ and $R_{adj}^2 = 0.87$ respectively).

Keywords: *Cylindrocarpon obtusiusculum*; growth regulators; *Miscanthus × giganteus*; modified media; plant survivability.

**Оптимізація процесу культивування мікроміцетів –
основи регуляторів росту та біотестування
їх рістстимулювальної активності щодо міскантусу гігантського**

А. І. Медков, Т. Р. Стефановська, В. В. Бородай
Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ, Україна

Анотація. Міскантус гігантський (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.) – багаторічна трав'яниста інтродукована енергетична гібридна рослина, біомасу якої після переробки використовують на тверде або рідке біопаливо. Рослина характеризується досить низьким рівнем поглинання забруднювачів з ґрунту вегетативними органами, оскільки її добре розвинена коренева система виступає як буфер, сприяє стабілізації забруднювачів у ґрунті та запобігає їх подальшому поширенню. Вирощування міскантусу гігантського (*M. × giganteus*) на техногенних ґрунтах, забруднених важкими металами та іншими ксенобіонтами, залежить від адаптаційних показників рослини, зокрема, швидкості приживлення та стійкості до стресових факторів. Одним із шляхів вирішення цього питання є застосування регуляторів росту рослин (PPP), а саме Стимпо та Регоплант, створених на основі мікроміцету *Cylindrocarpon obtusiusculum* (Sacc.) U. Braun, метаболіти якого є активною речовиною. Метою досліджень було оцінити можливості вирощування *C. obtusiusculum* на середовищі Чапека зі зміною вуглецевої складової глюкози на більш дешеві речовини – лактозу або крохмаль – для подальшого виробництва Стимпо та Регопланту і тестування їх стимулювальної активності на

M. × giganteus. Найбільш придатним для росту і накопичення біомаси *C. obtusiusculum* виявилося середовище Чапека, до складу якого входить крохмаль. Середня швидкість росту *C. obtusiusculum* була вищою на 8-му добу культивування у 2,3 раза порівняно з ростом на середовищі з глюкозою та в 3,3 раза порівняно з ростом на середовищі з лактозою. Встановлено, що на 6-ту добу росту концентрація накопиченої штамом біомаси була більш високою на модифікованому середовищі з єдиним джерелом вуглецю – крохмалем і досягала 2,47 г/л. На середовищі Чапека з глюкозою та лактозою концентрацію біомаси зареєстровано вдвічі нижчою. Отримані результати підтверджують можливість заміни глюкози – вартісного джерела глюкози Чапека – на крохмаль як дешевий інгредієнт для виробництва PPP. Культивування *C. obtusiusculum* за зміни джерела вуглецю не впливало на морфологічні ознаки та розвиток спороносних культур. На се-редовищі з крохмалем спостерігали пришвидшення росту та утворення метаболітів міцеліального гриба, які в подальшому використовували для отримання культуральної рідини та регуляторів росту рослин Стимпо та Регоплант. Виявлено їх рістстимулювальну активність щодо міскантусу гігантського, а саме позитивний вплив на показники приживлення та росту рослин. Статистичний аналіз довів, що джерела вуглецю в середовищі та тип препарату впливає на довжину коренів та наземної частини паростків міскантусу гігантського ($R_{adj}^2 = 0,91$ та $R_{adj}^2 = 0,87$, відповідно).

Keywords: *Cylindrocarpon obtusiusculum*; growth regulators; *Miscanthus × giganteus*; modified media; plant survivability.

Вступ

Міскантус гігантський (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.) – багаторічна трав'яниста інтродукована енергетична гібридна рослина, біомасу якої використовують як джерело твердого або рідкого біопалива (Lewandowski et al., 2000; Brosse et al., 2012; Shrestha et al., 2015; Kulyk et al., 2019). Культура вирізняється високою врожайністю та здатністю зростати на малородючих та забруднених ґрунтах (Chaney et al., 2014; Matyka and Kus, 2016; Barbosa et al., 2020). Рослина характеризується досить низьким рівнем поглинання забруднювачів з ґрунту вегетативними органами, оскільки її добре розвинена коренева система виступає як буфер, сприяє стабілізації забруднювачів у ґрунті та запобігає їх подальшому поширенню. Тому *M. × giganteus* має перспективи вирощування в умовах біоценозів на техногенних ґрунтах зі слабким та середнім рівнями забруднення з метою їх очищення та отримання біомаси для виробництва енергії (Drazic et al., 2017; Pidlisnyuk et al., 2019; Kharytonov et al., 2019). У процесі вирощування міскантусу гігантського на техногенних ґрунтах, забруднених важкими металами та іншими ксенобіотами, важливе значення має підвищення адаптаційних показників рослини, зокрема, приживлення та стійкості до стресових факторів (Kim et al., 2010; Milovanovic et al., 2012; Liu et al., 2018).

Як відомо, до складу багатьох регуляторів росту рослин входять біологічно активні речовини, що синтезуються мікроорганізмами, зокрема грибами – мікроміцетами (Jeong et al., 2013). Здатність синтезувати індоліліл оцтову кислоту та ауксин була виявлена в багатьох ризосферних та епіфітних бактерій. Зокрема, види роду *Cylindrocarpon* широко розповсюджені в різних країнах Європи, Америки та Африки (Kang et al., 2014). Ці гриби з високою частотою виділяються з ґрунтів листяних і хвойних лісів як сапрофіти, характеризуються значною конкурентною здатністю (Booth, 1966; Bylaj et al., 1988; Domsch et al., 2007). Види цього роду синтезують відомі регулятори росту рослин: індолілоцтову кислоту, цитокініни та гібереліни (Murovseva, 1979; Chi et al., 2009; Sharma and Kaur, 2017). Так, в країнах бывшего Радянського Союзу на основі штаму *Cylindrocarpon radiclecola* створено лінійку PPP препаратів, які позитивно впливають на рослини, стимулюючи їх ріст унаслідок синтезу різних корисних метаболітів (фітогормонів, амінокислот, жирних кислот, у тому числі арахідонової, ненасиченої жирної кислоти), що в свою чергу сприяє розвитку екологічно безпечних агробіотехнологій (Ponomarenko, 2003; Ponomarenko, 2014).

Закладання плантації міскантусу є високовартісним заходом, а використання регуляторів росту рослин на підготовчому етапі висаджування та висока вартість посадкового матеріалу – ризом міскантусу (у загальній сумі витрат вона становить 65–70%) надзвичайно здорожує згадану технологію. Таким чином, надзвичайної актуальності набувають пошуки шляхів здешевлення вартості PPP.

Гриби-мікроміцети вирощують на штучних живильних середовищах: сусло-агарі, картопляно-глюкозному агарі, середовищі Сабуро, а також на синтетичних агаризованих середовищах, наприклад на середовищі Чапека. До складу середовища Чапека зазвичай входять дорогі компоненти, які потрібні для росту гриба (Kang et al., 2014). Заміна або здешевлення компонентів середовища для культивування мікроміцетів може суттєво знизити ціну PPP.

Тому метою дослідження було: по-перше, дослідити можливість заміни глюкози – вартісної вуглеводневої складової середовища Чапека – на крохмаль та лактозу як дешевих інгредієнтів для виробництва PPP; по-друге, провести лабораторне випробування рістрегулювальної активності штаму гриба роду *Cylindrocarpon*, вирощеного з використанням крохмалю й лактози, та отримані дані порівняти з результатами стандартних компонентів середовища Чапека (глюкозою).

Матеріал та методи

Об'єктом досліджень було вивчення шляхів оптимізації процесу культивування мікроміцетів – основи регуляторів росту та біотестування їх рістстимулювальної активності щодо міскантусу гігантського. Предметом дослідження є мікроміцет *Cylindrocarpon obtusiusculum* (Sacc.) U. Braun (телеоморфна стадія *Neonectria ramulariae* Wollenw.), регулятори росту Стимпо і Регоплант та рослини міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.). Гриб *C. obtusiusculum* належить до родини Nectriaceae, порядку Hypocreales, підкласу Hypocreomycetidae, класу Sordariomycetes, підвідділу Pezizomycotina, відділу Ascomycota. Гриб депонований в Депозитарії штамів мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України за номером ІМВ F-100061. Штамп синтезує біологічно активні речовини, що є стимуляторами росту рослин (Ponomarenko, 2014).

Морфологічні дослідження та вимірювання спороносних структур і конідій штаму *C. obtusiusculum* проводили за допомогою методів світлової мікроскопії. Препарати культури мікроскопічного гриба готували з додаванням таких реагентів, як спирт, гліцерин і дистильована вода (1 : 1 : 1) (Bylaj et al., 1982). Морфологію гриба вивчали на світловому мікроскопі МБІ-6 та Leica DM 500 при збільшенні $\times 200$, $\times 320$ та $\times 400$, попередньо розрахувавши ціну поділки окуляр-мікрометра для кожного збільшення.

Мікроструктури мікроміцета фотографували за допомогою цифрової камери Nikon MH-60 (Японія).

Для культивування мікроміцетів у глибинних умовах на шейкерних установках за перемішування на рідких середовищах використовували пробірки діаметром 2,0 см та висотою 20 см; у кожену з них наливали 20 мл відповідного рідкого середовища. Посівний матеріал – стандартна суспензія (1×10^6 КУО/мл) 10-добової культури грибів, 10% (об/об) якої вносили в рідке поживне середовище (Bylaj et al., 1982).

Для накопичення біомаси на середовищах з різними вуглеводами культуру вирощували в глибинних умовах за температури $26 \pm 2^\circ\text{C}$ на рідкому поживному середовищі Чапека, яке містило джерела вуглецю (глюкозу, крохмаль, лактозу) в кількості, що була еквімолярною його вмісту в 20 г/л сахарози. Як єдине джерело вуглецю використовували D-глюкозу (СЧГ), лактозу (СЧЛ) і крохмаль (СЧК) – табл. 1.

Таблиця 1. Склад стандартного живильного середовища

Хімічний реактив	Кількість реактиву, г/дм ³
1. Д-глюкоза	10,0–15,0
2. Калій фосфорнокислий однозаміщений	0,9–1,5
3. Калій фосфорнокислий двозаміщений	0,3–0,7
4. Марганець (II) сірчаноокислий 5-водний	0,02–0,1
5. Мідь сірчаноокисла (II) 5-водна	0,02–0,1
6. Залізо (II) сірчаноокисле 7-водне	0,02–0,1
7. Магній сірчаноокислий 7-водний	0,2–0,5
8. Калій сірчаноокислий	0,1–0,5
9. L-аспарагін (кислота аспарагінова)	0,02–0,1

Критерієм використання грибом відповідного джерела вуглецю була біомаса, яку він утворював протягом культивування. Її концентрацію визначали гравіметрично після висушування до постійної маси за 70°C (Bylaj et al., 1982).

Ефективність застосування різних джерел вуглецю оцінювали за двома показниками: 1) накопичення біомаси гриба протягом 6 діб; 2) швидкість радіального росту мікроміцета шляхом періодичного вимірювання (кожні 2 доби) діаметра колоній гриба, що зростали на чашках Петрі.

Радіальну швидкість росту культур гриба обчислювали за формулою

$$Kr = (r_1 - r_0) / (t_1 - t_0),$$

де Kr – радіальна швидкість росту колоній;

r_0 – радіус колоній на початку дослідів t_0 ;

r_1 – радіус колоній у момент t_1 (Пануков, 1991).

Вивчення фітостимулювальної активності штаму грибів проводили на насінні тест-рослини (пшениці озимої) за модифікованою методикою С. П. Пономаренко (2003, ДСТУ 4138-2002), що передбачає визначення фізіологічної активності регуляторів росту рослин за величиною приросту коренів і надземної частини проростків пшениці.

Вплив модифікованих РРР на морфометричні показники міскантусу визначали в лабораторному модельному досліді

за методикою (Nebeska et al., 2018). Ризомі міскантусу попередньо обробляли модифікованими регуляторами росту рослин Стимпо й Регоплант, виробленими на вітчизняному підприємстві ДП МНТЦ “Агробіотех” НАН та МОН України. Регулятори росту застосовували для обробки ризомів безпосередньо перед висаджуванням у ґрунт та під час дворазового обприскування рослин, починаючи з фази три–чотири листки з інтервалом у два тижні.

Статистичну вірогідність впливу досліджених факторів оцінювали за допомогою дисперсійного аналізу (ANOVA) за допомогою пакета статистичних програм Statistica.

Результати

Аналіз показників швидкості росту гриба-мікроміцета на трьох середовищах свідчить про те, що СЧК, до складу якого входить крохмаль, виявилось найбільш придатним для росту мікроміцета *C. obtusiusculum*. Середня швидкість росту *C. obtusiusculum* була вищою на 8-му добу культивування у 2,3–3,3 раза порівняно з ростом на середовищі з глюкозою (СЧГ) та лактозою (СЧЛ) – рис. 1.

Варто відзначити, що пік росту грибів на середовищах з різними джерелами вуглецю спостерігався в різні терміни. Але ріст гриба уповільнювався на СЧГ, СЧЛ та СЧК одночасно на 14-ту добу культивування. Отримані результати узгоджуються з даними А. І. Чуєнко (2015).

Встановлено, що на 6-ту добу росту концентрація накопиченої біомаси була більш високою на модифікованому середовищі з єдиним джерелом вуглецю – крохмалем, досягаючи 2,47 г/л (рис. 2).

На поживному середовищі з глюкозою та лактозою концентрація біомаси була вдвічі нижчою. Отже, найкращими джерелами вуглецю для накопичення біомаси штамом *C. obtusiusculum* виявився крохмаль.

Відмінності за морфологічними ознаками грибів на трьох середовищах фіксували на 8 добу. У цей час у грибів на трьох середовищах спостерігалися цілком розвинені спорозні структури (рис. 3).

Штам мікроскопічного гриба *Cylindrocarpon obtusiusculum* добре зростає на природних (сусло-агар, картопляно-глюкозний агар, середовище Сабуро) та на синтетичних агаризованих середовищах (середовище Чапека).

Зазвичай на живильних середовищах колонії мікроміцета на 7-му добу росту досягають 4,4 см у діаметрі; повітряний міцелій білий, кремовий до голубувато-сірого, пластівчастий до повстистого; колонії від білих до блідо-бежевих, іноді набувають червоно-коричневого забарвлення. Конідіофори формуються як одиночні латеральні фіаліди або на бокових гілках, які галузяться один і більше разів, кожне відгалуження закінчується 1–3 фіалідами, 10–12 × 3–4 мкм. Макроконідії циліндричні зі заокругленими кінчиками, іноді злегка зігнуті, з однією перетинкою – 20–26 × 3 мкм, із 2–3 перетинками –

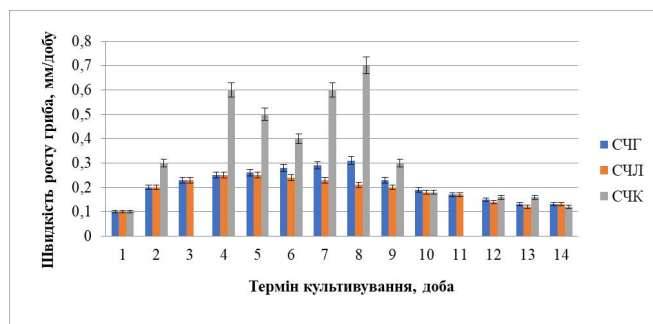


Рис. 1. Швидкість росту гриба-мікроміцета на трьох середовищах з різними джерелами вуглецю

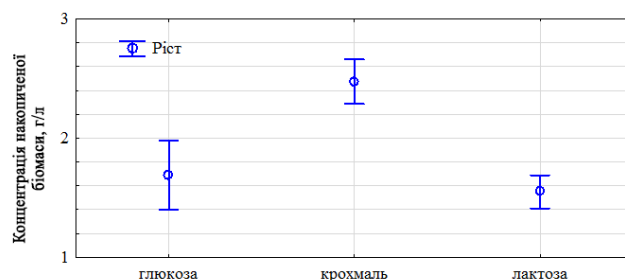


Рис. 2. Ріст *C. obtusiusculum* на середовищах з різними джерелами вуглецю ($F = 101,1$; $p < 0,001$)

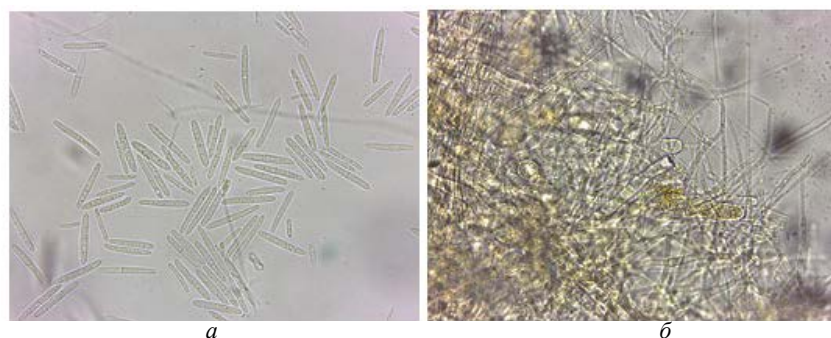


Рис. 3. Конідії (а) та хламідоспори (б) штаму *Cy lindrocarpon obtusiusculum*

22–32 × 3–4 мкм. Хламідоспори 9–12 мкм у діаметрі, особливо рясно утворюються на 13-ту добу культивування, незабарвлені, згодом коричневі, гладенькі, сферичні або іноді грушоподібні, інтеркалярні або термінальні, формуються поодинокі, у ланцюжках або групами на коротких бокових відгалуженнях (Booth, 1966; Domsch et al., 2007).

Культивування гриба при зміні джерела вуглецю не впливало на морфологічні ознаки та розвиток спороносних культур, однак саме на середовищі з розчинним крохмалем спостерігали пришвидшення росту та утворення метаболітів міцеліального гриба, які в подальшому використовували для отримання культуральної рідини та виготовлення модифікованих регуляторів росту рослин Стимпо та Регоплант.

Результати фітостимулювальної активності препаратів із використанням насіння тест-рослини пшениці озимої показали ефективність модифікованих регуляторів росту Стимпо та

Регоплант, створених на основі різних видів вуглеводів у складі середовища Чапека (рис. 4).

Довжина кореня паростків пшениці озимої статистично вірогідно залежить від джерела вуглецю в середовищі та типу препарату ($R_{adj}^2 = 0,98$; $F = 151,0$; $p < 0,001$). Довжина наземної частини паростків пшениці озимої статистично вірогідно залежить від джерела вуглецю в середовищі та типу препарату ($R_{adj}^2 = 0,97$; $F = 145,8$; $p < 0,001$).

Вплив двох модифікованих РРР, створених на основі різних видів вуглеводів у середовищі Чапека, на морфометричні показники міскантусу гігантського представлено на (рис. 5).

Довжина кореня паростків міскантусу гігантського статистично вірогідно залежить від джерела вуглецю в середовищі та типу препарату ($R_{adj}^2 = 0,91$; $F = 36,1$; $p < 0,001$). Довжина наземної частини паростків міскантусу гігантського статистично

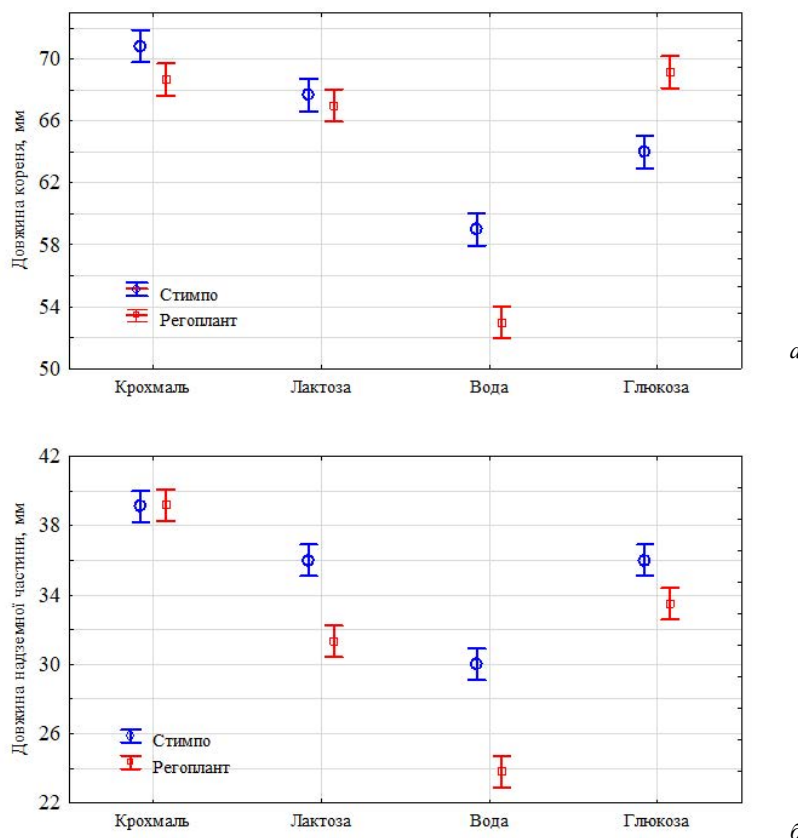


Рис. 4. Залежність довжини коренів (а) та довжини наземної частини (б) паростків пшениці озимої від джерела вуглецю в середовищі та типу модифікованого препарату

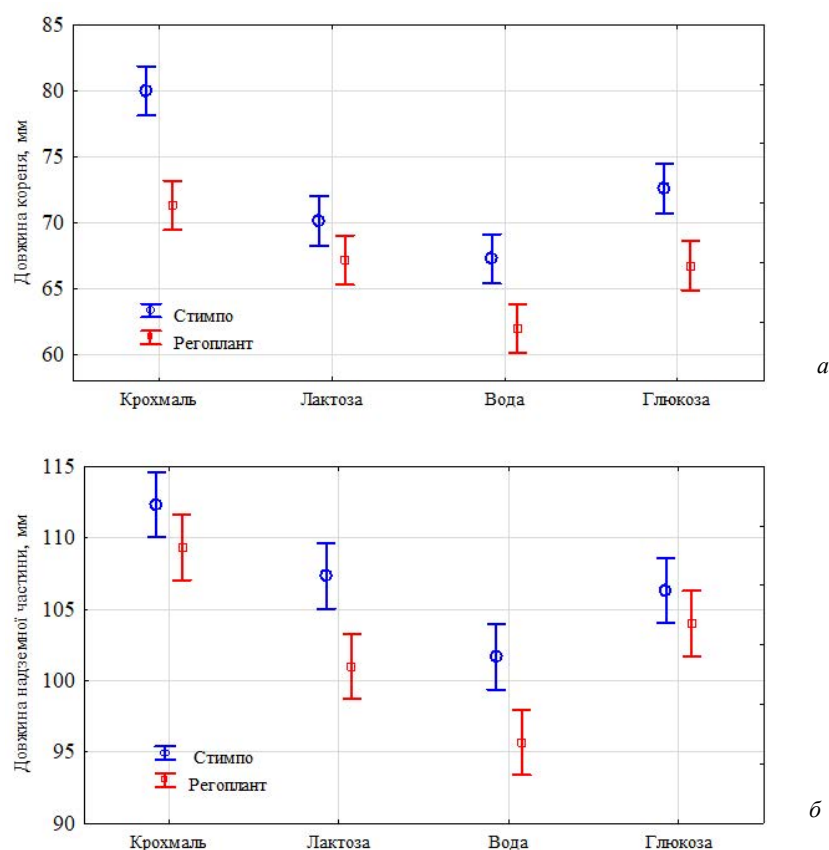


Рис. 5. Залежність довжини кореня (а) та довжини наземної частини (б) паростків міскантусу гігантського від джерела вуглецю в середовищі та типу модифікованого препарату

вірогідно залежить від джерела вуглецю в середовищі та типу препарату ($R_{adj}^2 = 0,87$; $F = 23,8$; $p < 0,001$).

Обговорення

Технологічне вдосконалення фітотехнологій ґрунтується на застосуванні різних агротехнічних, агрохімічних та біотехнологічних заходів (Verma et al., 2016; Alasmaly et al., 2020;). При вирощуванні міскантусу на чорноземі типовому найвищі показники біопродуктивності рослин були отримані за комбінованої обробки рістстимулювальними біопрепаратами Квантум Голд та Вимпел-К: після проведення дворазової позакореневої обробки та обприскуванням під час вегетації (Katelevsky, 2020).

Біостимулятори рослин (регулятори росту, арбускулярні мікоризні гриби) та речовини, що сприяють покращенню показників якості ґрунту (осад стічних вод, зола вугілля), позитивно впливають на ефективність процесу фітореMediaції та сприяють збільшенню продуктивності біомаси (Kołodziej et al., 2016; Drazic G. et al., 2017).

Надзвичайно актуальним останніми роками реєструється використання регуляторів росту рослин, що сприяють приживленню міскантусу гігантського і мають рістрегулювальний ефект у фітотехнологіях, при виробництві біомаси на малопродуктивних, слабкозабруднених важкими металами та деградованих ґрунтах (Nsanganwimana et al., 2014; Blanco-Canqui, H., 2016; Nebeská et al., 2019). Заслужують на увагу дослідження основних ефектів і взаємодії між симбіотичними грибами та цитокініноподібним регулятором росту тидіазуроном при вирощуванні міскантусу (Schmidt et al., 2017). Застосування тидіазурону зменшило утворення арбускулярної мікоризи та збільшило частоту заземлення міцеліїв (тобто базидіоміцетних

ендофітів). У наших дослідженнях виявлені умови прищивлення росту та утворення метаболітів міцеліального гриба.

Ефективність процесів фітореMediaції з використанням *M. × giganteus* на сильно забруднених металами ґрунтах визначена в модельних лабораторних експериментах (Chaney et al., 2014). Питанням впливу застосування *M. × giganteus* на мікробіоту забрудненого металами ґрунту в лабораторному модельному експерименті, аналізу потенційної токсичної концентрації металів на мікробну активність та фосфоліпідно-жирні кислоти (PLFA) присвячена низка робіт учених європейських країн (Nebeská et al., 2018; Nebeská et al., 2021). Виявлено позитивні зміни у структурі мікробної спільноти за впливу *M. × giganteus*. На основі вимірювання флуоресценції листя міскантусу за допомогою 24 індексів підтверджено, що застосування PPP під час вирощування рослин на забруднених ґрунтах сприяло підвищенню адаптаційних властивостей, зменшенню стресових реакцій, покращенню якості біомаси міскантусу (Malinská, 2020).

В умовах Полтавської області досліджено, що вирощування *M. × giganteus* на ґрунті, забрудненому нафтою (40 г/кг ґрунту), знизило вміст нафтопродуктів на 13% порівняно з контрольним варіантом – без рослин (Pysarenko, P., & Bezsonova, 2020). У наших попередніх дослідженнях уперше в Україні показано доцільність використання PPP Стімпо та Регоплант, в основу дії яких покладено синергетичний ефект взаємодії продуктів біотехнологічного культивування мікроміцетів роду *Cylindrocarpum*, отриманих з кореневої системи женьшеню, для підвищення показників продуктивності міскантусу на ґрунтах сільськогосподарського призначення (Zinchenko, 2013). Одними з основних завдань щодо біотехнології отримання PPP є скорочення витрат на виробництво препаратів. Останнім часом учені проводять пошук оптимізації елементів технології, тобто

заміни вартісних складових джерел вуглецю в середовищах для культивування продуцентів біологічно-активних речовин на більш дешеві інгредієнти. Так, проведено вивчення можливостей використання рослинних екстрактів у складі живильних середовищ для культивування грибів *Cylindrocarpon* spp. (Kang et al, 2014).

Отже, оптимізація процесу культивування мікроміцетів – основи регуляторів росту та біотестування їх рістстимулювальної активності щодо міскантусу гігантського, вивчення удосконалення елементів фітотехнологій за використання регуляторів росту рослин в Україні є недостатньо дослідженою, а отже, і актуальною проблемою.

Висновки

У результаті проведених досліджень оптимізовано процес культивування мікроміцетів – діючої речовини регуляторів росту Стимпо й Регоплант – та доведено їх рістстимулювальну активність щодо міскантусу гігантського (*Miscanthus* × *giganteus* Greef et Deu.).

Серед досліджуваних середовищ з різними джерелами вуглецю найбільш придатним для росту і накопичення біомаси *C. obtusiusculum* виявилось середовище, до складу якого входить крохмаль. Саме це підтверджує швидкість росту мікроміцета на різних за складом модифікованих середовищ. При цьому середня швидкість росту *C. obtusiusculum* була вищою у 2,3 раза порівняно з ростом на середовищі з глюкозою та в 3,3 раза з ростом на середовищі з лактозою. Концентрація накопиченої штамом біомаси на модифікованому середовищі виявилася найвищою і досягала 2,47 г/л. На поживному середовищі з глюкозою та лактозою концентрація біомаси була вдвічі нижчою.

З метою заміни вартісної вуглеводневої складової середовища Чаєка (глюкози) можливо рекомендувати крохмаль як дешевий інгредієнт для виробництва PPP.

Культивування гриба при зміні джерела вуглецю не впливало на морфологічні ознаки та розвиток спороносних культур, однак саме на середовищі з крохмалем спостерігали пришвидшення росту та утворення метаболітів міцеліального гриба. На основі отриманої культуральної рідини виготовлено модифіковані регулятори росту рослин Стимпо та Регоплант, які виявили фітостимулювальну активність щодо насіння тест-рослини пшениці озимої.

Замочування ризомів міскантусу в модифікованих регуляторах росту Стимпо та Регоплант з подальшим дворазовим обприскуванням рослин у період вегетації сприяло підвищенню приживлення ризомів та покращенню морфологічних показників росту міскантусу в модельних лабораторних дослідженнях на ґрунті, забрудненому важкими металами.

Отримані дані підтверджено статистичною вірогідністю залежності довжини коренів та надземної частини паростків міскантусу гігантського від джерела вуглеводів у середовищі та типу препарату ($R_{adj}^2 = 0,91$ та $R_{adj}^2 = 0,87$, відповідно).

У подальшому планується вивчення ефективності модифікованих регуляторів росту рослин з метою підвищення ефективності вирощування міскантусу гігантського на техногенних ґрунтах, забруднених важкими металами та іншими ксенобіотиками в польових умовах.

References

Alasmary, Z., Todd, T., Hettiarachchi, G., Stefanovska, T., Pidlisnyuk, V., Roozeboom, K., Erickson, L., Davis, L., & Zuckov, O. (2020). Effect of soil treatments and amendments on the nematode community under *Miscanthus* Growing in a Lead Contaminated Military Site. *Agronomy*, 10, 1727. doi: [10.3390/agronomy10111727](https://doi.org/10.3390/agronomy10111727)

Barbosa, B., Boléo, S., Sidella, S., Costa, J., Duarte, M. P., ... Fernando, A. L. (2015). Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Soils Using the Perennial Energy Crops *Miscanthus* spp. and *Arundo donax* L. *Bioenergy Research*, 8(4), 1500–1511. doi: [10.1007/s12155-015-9688-9](https://doi.org/10.1007/s12155-015-9688-9)

Blanco-Canqui, H. (2016). Growing dedicated energy crops on marginal lands and ecosystem services, *Soil Science Society of America Journal*, 80(4), 845–858. doi: [10.2136/sssaj2016.03.0080](https://doi.org/10.2136/sssaj2016.03.0080)

Booth, C. (1966). The genus *Cylindrocarpon*. *Mycological Papers. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, England: C.A.B.*, № 104-1. 56.

Brosse, N., Dufour, A., Meng, X., Sun, Q., & Ragauskas, A. (2012). *Miscanthus*: a fast-growing crop for biofuels and chemicals production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(5), 580–598. doi: [10.1002/bbb.1353](https://doi.org/10.1002/bbb.1353)

Bylaj, V., Bylaj, T., & Musych, E. (1982). Transformation of cellulose by fungi. *Naukova dumka, Kyiv* (in Ukrainian).

Bylaj, V., Gvozdzak, R., & Skrypal, Y. (1988). Microorganisms – causative agents of plant diseases. *Naukova dumka, Kyiv* (in Ukrainian).

Chaney, R. L., Reeves, R. D., Baklanov, I. A., Centofanti, T., Broadhurst, C. L., Baker, A. J. M., Angle, J. S., van der Ent A., & Rosenberg, R. J. (2014). Phytoremediation and phytomining: using plants to remediate contaminated or mineralized environments. Chapter 15. In: R. Rajakaruna, R. S. Boyd, T. Harris (Eds.), *Plant ecology and evolution in harsh environments*. Nova Science Publishers, New York, 365–391.

Chi, M. H., Park, S. Y., Kim, S., & Lee, Y. H. (2009). A quick and safe method for fungal DNA extraction. *Plant Pathology Journal*, 25, 108–111.

Chuienko, A. I. (2015). Micromycetes – potential biodestructors of rubber technical materials wastes in the climate of Ukraine. *Microbiology and Biotechnology*, 3(31), 21–29. doi: [10.18524/2307-4663.2015.3\(31\).53576](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2015.3(31).53576)

Domsch, K. H., Gams, W., & Anderson, T. H. (2007). *Compendium of soil fungi*. Second edition. IHW-Verlag, Eching.

Drazic, G., Milovanovic, J., Stefanovic, S., & Petric, I. (2017). Potential of *Miscanthus* × *giganteus* for heavy metals removing from industrial deposal. *Acta Regionalia et Environmentalica*, 2, 56–58. doi: [10.1515/arec-2017-0009](https://doi.org/10.1515/arec-2017-0009)

Jeong, S., Moon, H. S., Shin, D., & Nam, K. (2013). Survival of introduced phosphate-solubilizing bacteria (PSB) and their impact on microbial community structure during the phytoextraction of Cd-contaminated soil. *Journal of hazardous materials*, 263, 441–449.

Kang, Y., Lee, S. H., & Lee, J. (2014). Development of a Selective Medium for the Fungal Pathogen *Cylindrocarpon destructans* Using Radicol. *The plant pathology journal*, 30(4), 432–436. doi: [10.5423/PPJ.NT.08.2014.0073](https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.08.2014.0073)

Katelevsky, V. M. (2020). Efficiency of influence of foliar treatment by plant growth regulators on the parameters of *Miscanthus* biomass. *Agrology*, 3(1), 19–24. doi: [10.32819/020003](https://doi.org/10.32819/020003)

Kharytonov, M., Pidlisnyuk, V., Stefanovska, T., Babenko, M., Martynova, N., & Rula, I. (2019). The estimation of *Miscanthus* × *giganteus* adaptive potential for cultivation on the mining and post-mining lands in Ukraine. *Environ Sci Pollut Res Int.*, 26(3), 2974–2986. doi: [10.1007/s11356-018-3741-0](https://doi.org/10.1007/s11356-018-3741-0)

Kim, Y., C. Y., Rayburn, H. S., Widholm, A. L., & Juvik, J. A. (2009). Chromosome doubling of the bioenergy crop *Miscanthus* × *giganteus*. *GCB Bioenergy*, 1, 404–412. doi: [10.1111/j.1757-1707.2010.01032](https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2010.01032)

Kołodziej, B., Antonkiewicz, J., & Sugier, D. (2016). *Miscanthus* × *giganteus* as a biomass feedstock grown on municipal sewage sludge. *Industrial Crops and Products*, 81, 72–82. doi: [10.1016/j.indcrop.2015.11.052](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.052)

Kulyk, M. I., Galytska, M. A., Samoylik, M. S., & Zhornyk, I. I. (2019). Phytoremediation aspects of energy crops use in Ukraine. *Agrology*, 2(1), 65–73. doi: [10.32819/2617-6106.2018.140](https://doi.org/10.32819/2617-6106.2018.140)

Lewandowski, I., Clifton-Brown, J. C., Scurlock, J. M. O., & Huis-

- man, W. (2000). *Miscanthus*: European experience with a novel energy crop. *Biomass Bioenergy*, 19(4), 209–227. doi: [10.1016/S0961-9534\(00\)00032-5](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(00)00032-5)
- Liu, L., Li, W., Song, W., & Guo, M. (2018) Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: principles and applicability. *Sci. Total Environ.*, 633, 206–219. doi: [10.1016/j.scitotenv.2018.03.161](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.161)
- Malinská, H., Pidlisnyuk, V., Nebeská, D., Erol, A., Medžová, A., & Trögl, J. (2020). Physiological response of *Miscanthus × giganteus* to plant growth regulators in nutritionally poor soil. *Plants* 9, 194. doi: [10.3390/plants9020194](https://doi.org/10.3390/plants9020194)
- Matyka, M., & Kus, J. (2016). Influence of soil Quality for yielding and biometric features of *Miscanthus × giganteus*, *Polish Journal of Environmental Studies*, 25(1), 213–219. doi: [10.15244/pjoes/60108](https://doi.org/10.15244/pjoes/60108)
- Milovanović, J., Dražić, G., Ikanović, J., Jurekova, Z., & Rajković, S. (2012). Sustainable production of biomass through *Miscanthus × giganteus* plantantion development. *Annals of Faculty Engineering Hunedoara – International Journal of Engineering*, 10, 79–82.
- Murovceva, G. (1979). Plant growth regulators. Kolos. Moskow (in Russian).
- Nebeská, D., Malinská, A. H., Erol, A., Pidlisnyuk, V., Kurá, P., Medžová, A., Smaha, M., & Trögl, J. (2021). Stress Response of *Miscanthus* Plants and Soil Microbial Communities: A Case Study in Metals and Hydrocarbons Contaminated Soils. *Appl. Sci.*, 11, 1866. doi: [10.3390/app11041866](https://doi.org/10.3390/app11041866)
- Nebeská, D., Pidlisnyuk, V., Stefanovska, T., Trögl, J., Shapoval, P., Popelka, J., Černý, J., Medkov, A., Kvak, V., & Malinská, H. (2019). Impact of plant growth regulators and soil properties on *Miscanthus × giganteus* biomass parameters and uptake of metals in military soils. *Reviews on Environmental Health*, 34(3), 283–291. doi: [10.1515/reveh-2018-0088](https://doi.org/10.1515/reveh-2018-0088)
- Nebeská, D., Trögl, J., Pidlisnyuk, V., Popelka, J., Dáňová, P., Ustak, S., & Honzík, R. (2018). Effect of growing *Miscanthus × giganteus* on soil microbial communities in post-military soil. *Sustainability*, 10, 4021. doi: [10.3390/su10114021](https://doi.org/10.3390/su10114021)
- Nsanganwimana, F., Pourrut, B., Mench, M., & Douay, F. (2014). Suitability of *Miscanthus* species for managing inorganic and organic contaminated land and restoring ecosystem services. A review. *J. Environ. Manag.*, 143, 123–134. doi: [10.1016/j.jenvman.2014.04.027](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.04.027)
- Panykov, N. S. (1991). Microbial growth kinetics: general laws and environmental applications. Nauka. Moskow (in Russian).
- Pidlisnyuk, V., Erickson, L., Stefanovska, T., Popelka, J., Hettiarachchi, G., Davis, L., & Trögl, J. (2019). Potential phytomanagement of military polluted sites and biomass production using biofuel crop *Miscanthus × giganteus*. *Environmental Pollution*, 249, 330–337. doi: [10.1016/j.envpol.2019.03.018](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.018)
- Ponomarenko, (2014). Patent for invention № 104260 Ukraina, MPK (2014), C12R 1/645, C12N 1/14. Strain of micromycete *Cylindrocarpon obtusiusculum* IMB F-100061 for obtaining plant growth regulators with bioprotective effect; applicant and owner S.P. Ponomarenko. № заявки a 2013 03038; stated 12.03.2013; published 10.01.2014, Bull. № 1 (in Ukrainian).
- Ponomarenko, S. (2003). Plant growth regulators: monography. Kyiv (in Ukrainian).
- Pysarenko, P., & Bezsonova, V. (2020). Potential for the utilization of biofuel plant of the second generation of *Miscanthus giganteus* for phytoremediation of oil-contaminated lands. *Agrology*, 3(3), 127–132. doi: [10.32819/2020015](https://doi.org/10.32819/2020015)
- Schmidt, C. S., Mrnka, L., Frantík, T., Motyka, V., Dobrev, P. I., & Vosátka, M. (2017). Combined effects of fungal inoculants and the cytokinin-like growth regulator thidiazuron on growth, phytohormone contents and endophytic root fungi in *Miscanthus × giganteus*. *Plant Physiol Biochem.*, 120–131. doi: [10.1016/j.plaphy.2017.09.016](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.09.016)
- Sharma, S., & Kaur, M. (2017) Plant hormones synthesized by microorganisms and their role in biofertilizer-A review article. *Int. J. Adv. Res.*, 5(12), 1753–1762. doi: [10.21474/IJAR01/6144](https://doi.org/10.21474/IJAR01/6144)
- Shrestha, P., Ibáñez, A. B., Bauer, S., Glassman, S. I., Szaro, T. M., Bruns, T. D., & Taylor, J. W. (2015). Fungi isolated from *Miscanthus* and sugarcane: biomass conversion, fungal enzymes, and hydrolysis of plant cell wall polymers. *Biotechnology for Biofuels*, 8(38). doi: [10.1186/s13068-015-0221-3](https://doi.org/10.1186/s13068-015-0221-3)
- Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone – mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol.*, 16, 86. doi: [10.1186/s12870-016-0771-y](https://doi.org/10.1186/s12870-016-0771-y)
- Zinchenko, O. (2013). Evaluation of the influence of plant growth regulators on the intensity of photosynthesis, survival, morphological parameters of *Miscanthus giganteus*. *Scientific works of the institute bioenergy crops and sugar beets*, 19, 47–51 (in Ukrainian).