

В.П. Патика<sup>1</sup>, О.В. Кириченко<sup>2</sup>, С.Я. Коць<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

<sup>2</sup> Інститут фізіології рослин і генетики НАН України  
вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022, Україна

## СКРИНІНГ ТА СЕЛЕКЦІЯ ГРУНТОВИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ЗА ОЗНАКОЮ «АЗОТФІКСУЮЧА АКТИВНІСТЬ»

Із ризосфери рослин ярого ячменю та ґрунту методом аналітичної селекції виділено ізоляти мікроорганізмів та проведено їх відбір за ознакою «азотфіксуюча активність». Показано, що ізоляти відрізнялися за розміром утворюваних колоній і активністю росту на селективному середовищі Ешбі та характеризувалися здатністю до засвоєння молекулярного азоту, що визначає їх як діазотрофні мікроорганізми. Виявлено різний рівень інтенсивності та динаміки нітрогеназної активності ізолятів *in vitro*. Нові ізоляти ґрунтових мікроорганізмів доповнюють генетичний фонд діазотрофних бактерій із перспективою їх дослідження як основи або компонентів бактеріальних добрив.

*К л ю ч о в і с л о в а:* азотфіксуюча активність, ізоляти мікроорганізмів, селективне середовище, ґрунт, ризосфера, діазотрофи.

Біологічна азотфіксація – процес відновлення молекулярного азоту до аміаку, здійснюваний живими організмами [6]. В агроценозі рослин і азотфіксуючих мікроорганізмів (діазотрофів) відбувається симбіотична взаємовигідна кооперація, в якій бактерії зв'язують азот атмосфери за рахунок функціонування нітрогеназного ферментного комплексу [3] і переводять його у форму, що є доступною рослинам, тоді як продукти фотосинтетичної діяльності рослин є енергетичними субстратами для живлення, росту бактерій і перебігу процесу фіксації азоту. Властивість до діазотрофії характерна, здебільшого, для прокаріотів [6], які здатні заселяти майже всі екосистеми, оскільки мають перевагу в забезпеченні себе азотовмісними сполуками навіть в екологічних нішах із низьким вмістом або відсутністю азоту. За рахунок мікробної азотфіксації був створений та нині підтримується азотний статус усіх природних екосистем і біосфери в цілому. Загальна біологічна фіксація азоту на Землі становить  $17,2 \cdot 10^7$  тон на рік.

Азотфіксуючі мікроорганізми, як мікробні препарати [5], широко застосовуються в агробіотехнології для інокуляції насіння або обприскування по вегетації сільськогосподарських культур із метою покращення азотного живлення рослин, збереження та поліпшення стану ґрунтів і отримання екологічно чистої продукції рослинництва. Найбільш ефективною є інокуляція тими штамами бактерій, які були відселекціоновані з ризоплани або ризосфери того ж виду рослин, насіння яких піддають інокуляції. Для отримання нових штамів азотфіксуючих бактерій використовують традиційні методи аналітичної селекції, проводячи скринінг мікроорганізмів із природних джерел за агрономічно корисними властивостями, а також методи фізичного, хімічного й транспозонового мутагенезів [2, 4, 8, 11, 13]. Для ідентифікації ґрунтових мікроорганізмів застосовують як класичні методи оцінки культуральних, морфологічних, фізіолого-біохімічних властивостей бактерій [8], так і молекулярно-генетичні методи – ПЦР-аналіз генів *nifH*, що кодують азотфіксацію та 16S рРНК [4, 7, 9, 12].

Метою даної роботи був скринінг і селекція ізолятів ґрунтових мікроорганізмів як можливих діазотрофів, за ростом на селективному середовищі та нітрогеназною активністю в умовах *in vitro*.

**Матеріали і методи.** Ізоляти мікроорганізмів отримували з ґрунту і ризосферної зони рослин ярого ячменю (табл. 1). Ізоляти діазотрофів виділяли методом накопичувальних

культур, створюючи селективні умови їх розвитку, для чого використовували мінеральне поживне середовище Ешбі без сполук азоту з органічним джерелом енергії – сахарозою [1]. Селекцію ізолятів за ознакою «азотфіксуюча активність» в умовах *in vitro* проводили за здатністю бактерій рости на селективному середовищі, яке не містить азотних сполук, а також за оцінкою нітрогеназної активності бактеріальних культур *in vitro*.

Первинний скринінг ізолятів здійснювали за оцінкою росту культур на селективних середовищах Ешбі та Доберейнер [1]. У разі утворення декількох типів колоній, найбільш поширені з них висівали в пробірки з поживним агаровим середовищем. Чистоту культур ізолятів отримували шляхом багаторазового пересіву бактерій на селективне середовище Ешбі та на манітно-дріжджовий агар [1].

Наступним етапом відбору було визначення азотфіксуючої здатності ізолятів, які активно росли на селективному середовищі. Ферментна нітрогеназна система характеризується низькою субстратною специфічністю та здатна відновлювати широкий спектр сполук із потрійними зв'язками, в тому числі й ацетилен. На відновленні ацетилену заснований метод визначення активності нітрогенази [10]. При цьому ацетилен відновлюється до етилену, кількісний вміст якого визначається з використанням газової хроматографії. Азотфіксуючу активність (АФА) ізолятів тестували у рідкій культурі на середовищі Доберейнер. Культури мікроорганізмів вирощували протягом 3 діб у колбах-качалках при 160 об/хв і температурі 28° С. Методом граничних розведень [1] із подальшим висівом бактеріальної суспензії на тверде селективне середовище Ешбі та підрахунком колоній, що на них вирости, проведено оцінку чисельності бактерій. Бактеріальні суспензії (20 мл) із відомим титром клітин (10<sup>9</sup> кл/мл) вносили у герметичні флакони (50 мл), з яких відбирали по 5 мл газової фази і вводили по 5 мл ацетилену та інкубували протягом 2 год при 28° С. Після завершення інкубації з кожного флакона відбирали по 1 мл газової суміші та дану пробу аналізували на газовому хроматографі «Chromatograf 504» («Mera Elwgo», Польща) у режимі полум'яно-іонізаційного детектування. АФА мікроорганізмів виражали в наномолях етилену, утворення якого з ацетилену здійснено бактеріальними клітинами (10<sup>9</sup> кл/мл) за дві години інкубації. В таблицях наведено середні арифметичні значення 3-х повторень і стандартні похибки (M±m).

**Результати та їх обговорення.** У результаті проведеної роботи з ґрунту та ризосферної зони рослин ячменю ярого (табл. 1) методом аналітичної селекції виділені 30 ізолятів мікроорганізмів, які були здатними до росту на селективних середовищах Ешбі та Доберейнер. За активністю росту на даних середовищах відібрано 10 ізолятів (табл. 1), які надалі були протестовані за нітрогеназною та ростовою активностями.

Таблиця 1

**Колекція ізолятів мікроорганізмів, виділених із ґрунту та ризосферної зони ячменю ярого**

Ізолят	Рік отримання	Місцевість	Джерело	Характеристика ґрунту
Я1	2003	Київська обл., Васильківський р-н, смт. Глеваха	ризосфера ярого ячменю	світло-сірий опідзолений супіщаний, гумус 1,6–1,7 %, рухомий фосфор 5 мг, калій 10 мг, легко гідролізований азот 11 мг на 100 г ґрунту, рН 6,0
Я2				
Я3				
П2	2005	Київська обл., Бородянський р-н, смт. Бородянка	ґрунт без рослин	дерново-підзолистий супіщаний, гумус 1,1 %, рухомий фосфор 8,4 мг, калій 6,4 мг, легко гідролізований азот 8,1 мг на 100 г ґрунту, рН 4,0
П1-5				
П2-5				
1/3	2006			
5/2				
4/3				
4/4				

Скринінг ізолятів за активністю росту на середовищі Ешбі дозволив виділити ізоляти, які характеризувалися найвищою ростовою активністю, а саме, ізоляти Я3, П2-5, 4/3, 5/2, 4/4 (табл. 2). Колонії, які утворювали досліджувані мікроорганізми на селективному середовищі, також різнилися між собою за розміром (від дуже дрібних – діаметром до 1 мм, до достатньо великих – діаметром 3–5 мм), кольором (прозорі, білі, матові), консистенцією. Ізоляти Я3, П2-5, 4/4, 4/3, 5/2 характеризувались активним слизеутворенням (продукцією позаклітинних полісахаридів) – однією з важливих агрономічно цінних властивостей ризобактерій, яка дозволяє формувати асоціації мікроорганізмів із коренем рослини, забезпечує захист бактеріальних клітин від несприятливих факторів довкілля тощо.

**Таблиця 2**

**Характеристика 10 ізолятів мікроорганізмів за активністю росту на селективному середовищі Ешбі**

Ізолят	Інтенсивність росту	Характеристика колоній
Я1	++	Білі, круглі, з рівним краєм, d до 2 мм
Я2	++	Матові, круглі, випуклі, d до 1 мм
<b>Я3</b>	+++	Прозорі, слизові, круглі, випуклі, d до 3 мм
<b>П2</b>	++	Білі, з рівним краєм, творожисті d до 2 мм
П1-5	++	Білі, безслизові, d до 2 мм
<b>П2-5</b>	+++	Прозорі, слизові, з рівним краєм, d до 5 мм
1/3	++	Прозорі, безслизові, d до 3 мм
5/2	++	Прозорі, слизові, з рівним краєм, d до 4 мм
<b>4/3</b>	++	Прозорі, слизові, круглі, випуклі, d до 3 мм
<b>4/4</b>	+++	Прозорі, слизові, круглі, випуклі, d до 5 мм

Примітка: жирний шрифт – перспективні ізоляти за комплексом позитивних властивостей – інтенсивністю росту, утворенням слизу, нітрогеназною активністю.

Отже, усі досліджувані ізоляти росли на селективних середовищах Ешбі та Доберейнер, що характеризує їх як мікроорганізми, які здатні забезпечувати себе азотовмісними сполуками, тобто як діазотрофи.

При визначенні нітрогеназної активності ізолятів (рисунок, табл. 3) встановлено здатність даних мікроорганізмів до засвоєння молекулярного азоту, оскільки всі культури, в більшій чи меншій мірі, відновлювали ацетилен до етилену. Зафіксовано різну інтенсивність АФА (від 5 до 450 нмоль  $C_2H_4$ /(млрд. бактеріальних клітин за 2 год) ізолятів в умовах *in vitro*.

У ізолятів, виділених із ризосфери рослин ячменю ярого (рис. А), характер зміни нітрогеназної активності описувався гіперболоподібною кривою. При цьому ізолят Я3 мав найвищі показники інтенсивності АФА, ізолят Я2 – мінімальні значення. Серед ізолятів, виділених у 2005 р. з ґрунту (П2, П1-5, П2-5: рис. Б), ізолят П2 проявляв суттєву АФА (13,5–13,8 нмоль  $C_2H_4$ ) майже на одному рівні (лінійна) протягом усього періоду досліджень. Високу інтенсивність азотфіксації у молодій культурі (3 доби) з тенденцією до лінійного зниження у 11-добової культури мікроорганізмів (від 18,2 до 10,4 нмоль  $C_2H_4$ ) відмічено у ізоляту П2-5. АФА ізоляту П1-5 характеризувалася високим вихідним рівнем у 3-добової культури (16,0 нмоль  $C_2H_4$ ), різким зниженням у 5-добової (7,7 нмоль  $C_2H_4$ ) та зростанням до 11,5 нмоль у 11-добової культури та описувалася параболоподібною

кривою. Ізоляти, виділені з ґрунту в 2006 р. (рис. В, табл. 3) відрізнялися між собою за інтенсивністю та динамікою АФА. Майже лінійне підвищення здатності до фіксації азоту від 13,4 до 20,7 нмоль  $C_2H_4$  відмічено у ізоляту 5/2, тоді як ізолят 4/3 характеризувався лінійним зниженням АФА (від 13,3 до 8,6 нмоль  $C_2H_4$ ) при достатньо суттєвому її рівні у 3-добової культури. Динаміка АФА ізоляту 1/3 була подібною до ізолятів, виділених із ризосфери рослин ячменю (рис. А), і описувалася гіперболоподібною кривою. Для ізоляту 4/4 (табл. 3) встановлено подібну до ізоляту П1-5 (рис. Б) динаміку АФА, яка описувалася параболоподібною кривою.

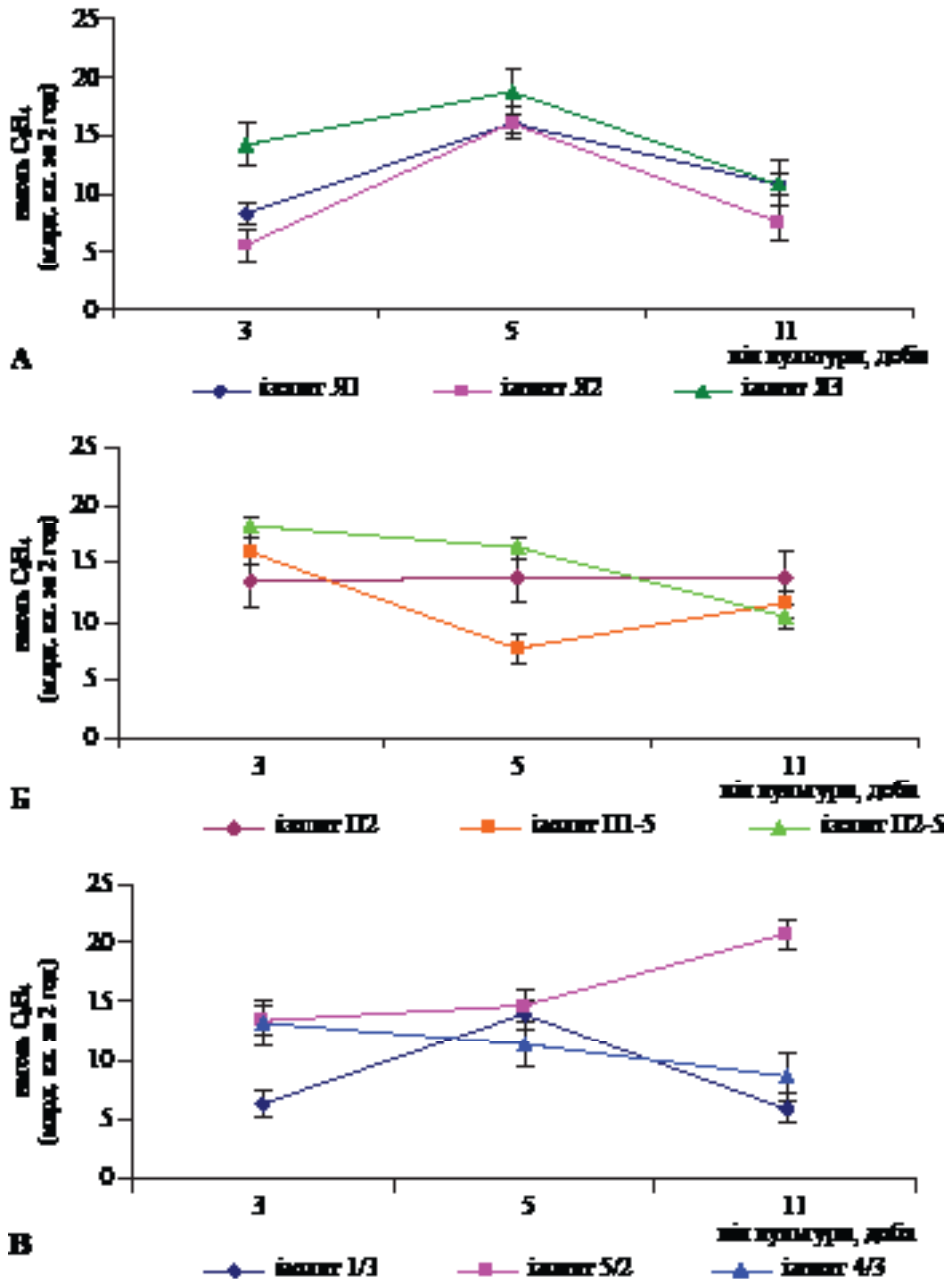


Рисунок. Динаміка нітрогеназної активності ізолятів ґрунтових мікроорганізмів в умовах *in vitro*.

А – ізоляти виділені з ризосфери рослин ярого ячменю в 2003 р.;

Б – ізоляти виділені з ґрунту в 2005 р.; В – ізоляти виділені з ґрунту в 2006 р.

Динаміка нітрогеназної активності в умовах *in vitro* ізоляту 4/4, виділеного з ґрунту в 2006 р.

Ізолят	Вік культури, доба		
	3	5	11
	нмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /(млрд. кл. за 2 год)		
4/4	14,0±0,3	9,2±1,4	449,2±101,7

Отже, за динамікою нітрогеназної активності культур досліджуваних ізолятів подібними є ізоляти Я1, Я2, Я3, 1/3 (гіперболоподібна крива), ізоляти П1-5 і 4/4 (параболоподібна крива), ізоляти П2 і 4/3 (лінійна на зниження, з високим вихідним рівнем), ізолят 5/2 (лінійна на підвищення у 11-добової культури порівняно до 3-добової).

Згідно з нашими попередніми дослідженнями, ґрунтові діазотрофи характеризує різна здатність до відновлення молекулярного азоту в умовах *in vitro*: від 0,5–0,7 та 1,6–3,0 нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> [2] до 44 нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> [14]. Отже, нові ґрунтові ізоляти, протестовані за ознакою «азотфіксуєча активність» в умовах *in vitro* мають достатньо високий рівень нітрогеназної активності (від 5 до 20 нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), що вказує на перспективність їхнього подальшого дослідження за даною ознакою в умовах *in situ*. Серед усіх досліджених ізолятів за ознакою «азотфіксуєча активність» виділений ізолят 4/4, який характеризувався максимальною інтенсивністю відновлення ацетилену (до 450 нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), що припускає належність даного ізоляту до одного з видів бульбочкових бактерій, які характеризуються значно вищими показниками (в 10–100 разів) азотфіксуєчої здатності [3], ніж асоціативні та вільноіснуючі діазотрофи.

Як перспективні слід відмітити ізоляти, що поєднують декілька агрономічно цінних ознак, зокрема, активний ріст на селективному середовищі, інтенсивне формування позаклітинних полісахаридів (слизу) та достатньо високий рівень АФА *in vitro*. До таких ізолятів віднесено Я3, П2, П2-5, 4/3 і 4/4 (табл. 2). Дані культури (пробірочна культура на агарі) зберігаються в колекції азотфіксуєчих мікроорганізмів відділу симбіотичної азотфіксації ІФРГ НАНУ на селективному середовищі Ешбі та маннітно-дріжджовому й бобовому агарі – середовища багаті на елементи живлення для бактерій. Культури переживаються двічі на рік.

Отже, методом аналітичної селекції з ґрунту та ризосферної зони рослин ячменю ярого виділено ізоляти мікроорганізмів, які були здатними до активного росту на селективних середовищах і проявляли здатність до відновлення ацетилену в умовах *in vitro*, що характеризує дані бактерії як діазотрофи. Виявлено різний рівень інтенсивності та динаміки нітрогеназної активності ізолятів *in vitro*. Нові ізоляти ґрунтових мікроорганізмів доповнюють генетичний фонд діазотрофних бактерій із перспективою їх дослідження як основи або компонентів бактеріальних добрив для зернових і технічних культур.

**Патыка В.Ф.<sup>1</sup>, Кириченко Е.В.<sup>2</sup>, Коць С.Я.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

<sup>2</sup> Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ

### СКРИНИНГ И СЕЛЕКЦИЯ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПО ПРИЗНАКУ «АЗОТФИКСИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ»

#### Резюме

Из ризосферы растений ярого ячменя и почвы методом аналитической селекции выделены изоляты микроорганизмов и проведен их отбор по признаку «азотфиксирующая активность». Показано, что изоляты отличались по размерам образованных колоний и активности роста на селективной среде Эшби, а также характеризовались способностью к усвоению молекулярного азота, что определяет их как диазотрофные микроорганизмы. Выявлен разный уровень интенсивности и динамики нитрогеназной активности изолятов *in vitro*. Новые изоляты почвенных микроорганизмов дополняют генетический фонд диазотрофных бактерий с перспективой их исследования как основы или компонентов бактериальных удобрений.

Ключевые слова: азотфиксирующая активность, изоляты микроорганизмов, селективная среда, почва, ризосфера, диазотрофы.

## **SCREENING AND SELECTION OF THE SOIL MICROORGANISMS ON THE ABILITY OF “NITROGEN-FIXING ACTIVITY”**

### **S u m m a r y**

The isolates of microorganisms from the rhizosphere of spring barley plants and soil at the use of analytical selection method was isolated. Its isolates on the ability of “nitrogen-fixing activity” was tested. It was shown that isolates of microorganisms had different of the colonies formed and cultural growth on the Eshbi's selective medium as well as the ability to fixing of molecular nitrogen. The different levels of intensity and dynamics of isolates nitrogenase activity *in vitro* were identified. New isolates of the soil microorganisms complement of the gene pool diazotrophic bacteria. Its isolates are perspective for the study as the basis or components of the bacterial fertilizers for the crops.

**К е у в о р д**: nitrogen-fixing activity, isolates of microorganisms, selective medium, soil, rhizosphere, diazotrophs.

1. Антупчук А.Ф., Піляшенко-Новохатний А.І., Свдокименко Т.М. Практикум з мікробіології. Навч. посіб. – К.: Університет «Україна», 2011. – 156 с.
2. Кириченко О.В., Титова Л.В., Коць С.Я. Скринінг ефективних азотфіксуючих мікроорганізмів ризосферного ґрунту // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. – К.: Логос, 2007. – С. 351–355.
3. Коць С.Я., Морзун В.В., Патыка В.Ф., Даценко В.К., Кругова Е.Д., Кириченко Е.В., Мельникова Н.Н., Михалків Л.М. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобияльный симбиоз: Монография в 4 т. / Т. 1. – К.: Логос, 2010. – 306 с.
4. *Определитель* бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С Уильямса. – М.: Мир, 1997. – 432 с.
5. Тихонович И.А., Круглов Ю.В. Биопрепараты в сельском хозяйстве (Методология и практика использования микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве) – М.: Россельхозакадемия, 2005. – 154 с.
6. Умаров М.М. Азотфиксация в биосфере и биотехнологический потенциал диазотрофов // Бюл. Моск. о-ва испыт. природы. Отд. биол. – 2007. – прил. № 1. – С. 150–155.
7. Bhatia R., Ruppel S., Narula N. Diversity studies of *Azotobacter* spp. from cotton-wheat cropping system of India // J. Basic Microbiol. – 2008. – **48**, N 6. – P. 455–463.
8. Bolzan de Campos S., Wurdig R.L.F., Bodanze Z.M.H., Pereira P.L.M. Relationship between *in vitro* enhanced nitrogenase activity of an *Azospirillum brasilense* Sp7 mutant and its growth-promoting activities *in situ* // Curr. Microbiol. – 2006. – **53**, N 1. – P. 43–47
9. Burgmann H., Meier S., Bunge M., Widmer F., Zeyer J. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community // Environ. Microbiol. – 2005. – **7**, N 11. – P. 1711–1724.
10. Hardy R.W.F., Burns R.C., Holsten R.D. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation // Soil. Biol. Biochem. – 1973. – **5**, N 1. – P. 41–83.
11. Khalid A., Arshad M., Zarhir Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat // J. Appl. Microbiol. – 2004. – **96**, N 3. – P. 473–480.
12. Tan Z., Hurek T., Reinhold-Hurek B. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice // Environ. Microbiol. – 2003. – **5**, N 10. – P. 1009–1015.
13. Xie C.-H., Yokota A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa* // Int. J. Syst. and Evol. Microbiol. – 2005. – **55**, N 4. – P. 1435–1438.
14. Патент України на винахід № 62820А, С05F11/08, С12N1/20. Штам бактерій *Azotobacter chroococcum* T79 для одержання бактеріального добрива під сою / С.Я. Коць, Л.В. Титова, О.В. Кириченко, С.В. Омельчук, А.В. Жемойда. – Опубл. 15.12.2003.

Отримано 12.06.2014