

УДК 579.26: 631.461.5

ДІАЗОТРОФИ КОРЕНЕВОЇ ЗОНИ РОСЛИН ПШЕНИЦІ ЯРОЇ

Надкернична О.В., Копилов Є.П.

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН,
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна
e-mail: isgm@ukrpost.ua

З кореневої зони рослин пшениці ярої виділено активні азотфіксувальні бактерії родів: Azotobacter, Azospirillum, Bacillus, Flavobacterium, Enterobacter, Pseudomonas. Вивчено здатність діазотрофів до формування асоціативних систем з пшеницею ярою. Найсуттєвіше збільшення активності фіксації молекулярного азоту в кореневій зоні рослин відмічено при використанні представників роду Azospirillum.

Ключові слова: діазотрофи, пшениця яра, асоціативна азотфіксація.

Проблема біологічної фіксації атмосферного азоту, незважаючи на майже столітню історію, залишається однією з найважливіших у біологічній науці. У 70-х роках минулого століття було виявлено феномен підвищення рівня азотфіксувальної активності в кореневій зоні рослин, який одержав назву асоціативної азотфіксації. Дослідження з цього напрямку розпочалися з робіт J. Dobereiner [1], де вона висловила припущення, що ріст і формування біомаси тропічних трав здійснюється за рахунок фіксації атмосферного азоту. У багатьох наступних дослідженнях було показано, що азотфіксувальні бактерії легко вступають в асоціації з різними небобовими рослинами, в яких рослина-донор поставляє діазотрофам доступні джерела вуглецю і фосфору та створює сприятливі умови для перебігу процесу азотфіксації, при цьому сама споживає асимільований азот. Завдяки утворенню таких асоціацій діазотрофи краще пристосовуються до умов навколишнього середовища і мають переваги в живленні перед

іншими мікроорганізмами.

Найпривабливішим у практичному аспекті видається створення стійких асоціацій культурних рослин з діазотрофами, одержаними шляхом аналітичної селекції з агробіоценозів, що можна вважати одним із важливих заходів, направлених на збереження біологічної різноманітності і стабільності довкілля.

Метою даної роботи було дослідити азотфіксувальне мікробне угруповання кореневої зони рослин пшениці ярої та одержати культури діазотрофів, які здатні формувати активні асоціації з рослинами.

Матеріали і методи. Азотфіксувальні бактерії виділяли з ґрунту міжрядь, ризосфери та відмитих коренів рослин пшениці ярої, яку вирощували за умов дрібноділянкового польового досліду на чорноземі вилугуваному неглибокому легкосуглинковому на лесовидних суглинках.

Виділяли активні діазотрофи із накопичувальних культур після визначення їхньої нітрогеназної активності [2]. Накопичувальні культури, нітрогеназна активність яких перевищувала 0,3 мкг азоту на 1 мл поживного середовища, розсівали на тверді середовища: картопляний агар, Касераса, Доберейнер, Ешбі, агаризоване середовище з гліцерином.

Нітрогеназну активність чистих культур діазотрофів визначали ацетиленовим методом на газовому хроматографі «Chrom-4» з полум'яноіонізаційним детектором. Колонка довжиною 370 см заповнена хромсорбом з β - β -оксидіпропіонітрилом, температура термостату 50 °С, газ-носій – азот, витрата газів (у мл/хвилину): водню – 30, азоту – 100, повітря – 500.

Вегетаційні досліди проводили у вегетаційному будиночку на чорноземі вилугуваному, який характеризувався такими агрохімічними показниками: вміст гумусу в орному шарі – 3,6 %, рухомих форм фосфору (за Кірсановим) – 210–240 мг P_2O_5 , обмінного калію (за Кірсановим) – 160–170 мг K_2O на 1 кг ґрунту, $pH_{\text{вод.}}$ – 6,5. Вологість ґрунту підтримували на рівні 60 % від повної вологоємності. Використовували гончарні вазони розміром 12×15 см, ємністю 2,0 л. Насіння пшениці ярої сорту Рання 93 висівали на глибину 2,0 см, кількість рослин у кожній посудині

складала 20 одиниць. Повторність досліду 10-разова.

Схема дослідів: 1 – без інокуляції (контроль); 2 – інокуляція діазотрофами. Культури діазотрофів для дослідів вирощували протягом трьох діб на середовищах: бактерії роду *Pseudomonas* – на твердому середовищі з гліцериним, *Azotobacter* – на середовищі Ешбі з манітом, *Flavobacterium* – на середовищі Ешбі з глюкозою, *Bacillus* – на картопляному агарі з глюкозою, *Enterobacter* – на агаризованому гороховому середовищі, *Azospirillum* – на картопляному агарі з малатом. Насіння перед посівом обробляли суспензією діазотрофів з розрахунку 200–300 тис. бактеріальних клітин на одну насінину. Тривалість дослідів становила 30–40 діб після появи сходів, після закінчення вказаного терміну визначали активність азотфіксації ацетиленовим методом у непорушеному моноліті ґрунту з коренями.

Результати та обговорення. Як свідчать результати проведених досліджень, у ризосфері і ризоплані пшениці ярої створюються сприятливі умови для розвитку азотфіксувальних бактерій різних таксономічних і еколого-трофічних груп.

Методами аналітичної селекції з різних сфер кореневої зони пшениці ярої нами було виділено понад 1000 накопичувальних культур діазотрофів. Встановлено, що серед них лише 310 культур (31 %) виявляли нітрогеназну активність, що перевищувала 0,3 мкг азота на 1 мл живильного середовища за добу. У чисту культуру виділено 60 культур із високою нітрогеназною активністю.

Розподіл виділених активних штамів діазотрофів за родами показано на рис. 1.

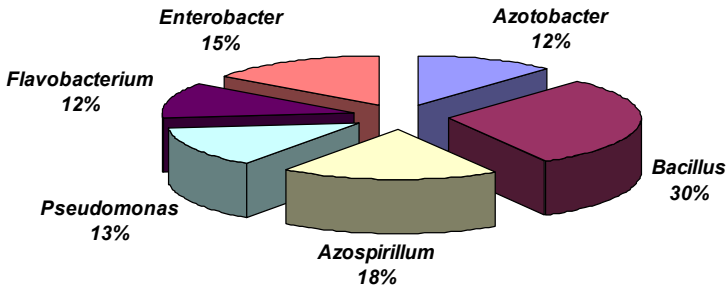


Рис. 1. Родовий склад азотфіксувального комплексу кореневої зони рослин пшениці ярої

Найбільша кількість активних штамів (30 %) належали до роду *Bacillus*. Число представників інших родів істотно не відрізнялося: 18 % – бактерії роду *Azospirillum*, 15 % – *Enterobacter*, 13 % – *Pseudomonas*, по 12 % – *Flavobacterium* та *Azotobacter*.

За умов вегетаційних дослідів оцінювали здатність виділених активних діазотрофів формувати ефективні асоціації з рослинами пшениці ярої. З літератури відомо, що для віднесення діазотрофа до асоціативних мікроорганізмів недостатньо ґрунтуватися тільки на його здатності активно фіксувати молекулярний азот у чистій культурі на живильному середовищі. Необхідно впевнитися в його спроможності підсилювати процес асоціативної азотфіксації при інтродукції в кореневу зону рослин, оскільки не існує прямої залежності між нітрогеназною активністю в чистій культурі і в асоціації з рослиною. Ті штами, що активно фіксували азот у чистій культурі, часто були неспроможними формувати ефективні азотфіксувальні асоціації з рослинами і навпаки [3]. Цей факт узгоджується з поглядами деяких авторів, що визначальним чинником утворення ефективних асоціацій діазотрофів з рослинами і підвищення продуктивності інокульованих рослин є багатofункціональний вплив ризосферних діазотрофів на рослину [4], а як наслідок – поліпшення азотного живлення сільськогосподарських культур за рахунок фіксації молекулярного азоту.

На рис. 2 представлено здатність діазотрофів роду *Azotobacter* утворювати асоціації з рослинами пшениці ярої і сприяти підвищенню нітрогеназної активності в зоні коріння. Як свідчать дані рис. 2, асоціативна азотфіксувальна активність у кореневій зоні рослин пшениці ярої при інокуляції азотобактером коливалася від 1,7 до 2,3 мкг азоту/рослину за годину залежно від застосованого штаму, тобто всі виділені штами сприяли збільшенню зазначеного показника в 2,8–3,8 раза у порівнянні з варіантом без інокуляції. Звертає на себе увагу той факт, що чисті культури азотобактера за активністю азотфіксування значно розрізнялися між собою (у 1,5–4,3 раза), у той же час різниця в асоціативній азотфіксації пшениці ярої сорту Рання 93 за інокуляції цими штамами була значно меншою – не більше, ніж на 35 %.

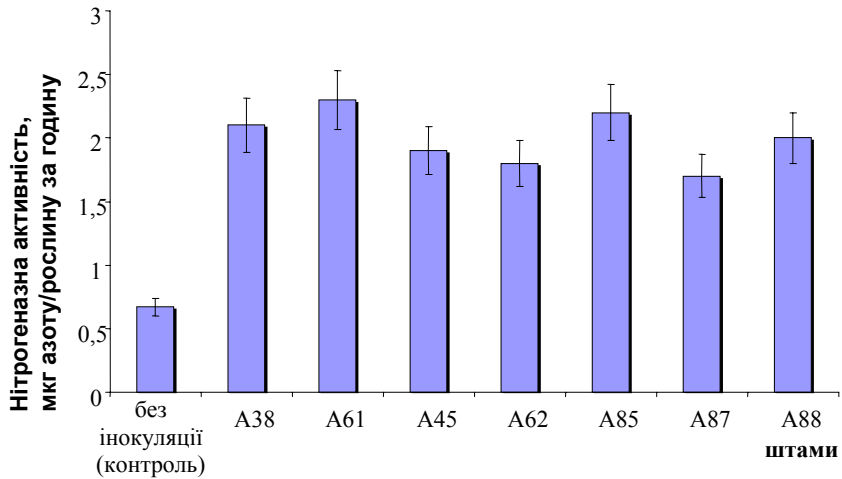


Рис. 2. Нітрогеназна активність азотобактера в асоціації з рослинами пшениці ярої сорту Рання 93

Здатність діазотрофів роду *Bacillus* утворювати асоціації з пшеницею ярою і сприяти підвищенню нітрогеназної активності в кореневій зоні рослин представлено на рис. 3.

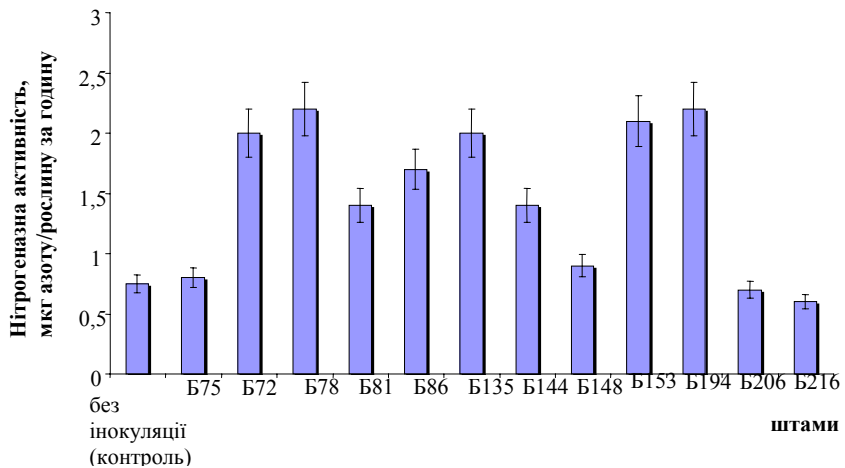


Рис. 3. Нітрогеназна активність бацил в асоціації з рослинами пшениці ярої сорту Рання 93

За результатами, представленими на рис. 3, можна зробити висновок, що не всі виділені штами бацил, які в чистій культурі

фіксували молекулярний азот, були здатні утворювати активні азотфіксувальні асоціації з рослинами пшениці ярої. Так, нітрогеназна активність у кореневій зоні рослин, інокульованих *Bacillus sp.* Б75, *Bacillus sp.* Б148, *Bacillus sp.* Б206, залишалася на рівні показників контрольних рослин. Решта штамів забезпечили підвищення активності асоціативної азотфіксації, яка коливалася в межах від 1,4 до 2,3 мкг азоту/рослину за годину. При цьому не спостерігалось кореляції між активністю азотфіксації в чистій культурі і в асоціації з рослинами пшениці ярої. Так, штам *Bacillus sp.* Б75 виявляв максимальну нітрогеназну активність у чистій культурі (2,8 мкг азоту на 1 мл живильного середовища за добу), і в той же час, при його інтродукції в кореневу зону рослин не відмічено підвищення рівня асоціативної азотфіксації. Деякі штами бацил (*Bacillus sp.* Б78, *Bacillus sp.* Б135, *Bacillus sp.* Б194) характеризувалися високою нітрогеназною активністю як у чистій культурі, так і в асоціації з рослинами пшениці ярої.

Виділені діазотрофи роду *Pseudomonas* також були здатні утворювати активні асоціативні системи з пшеницею ярою (рис. 4).

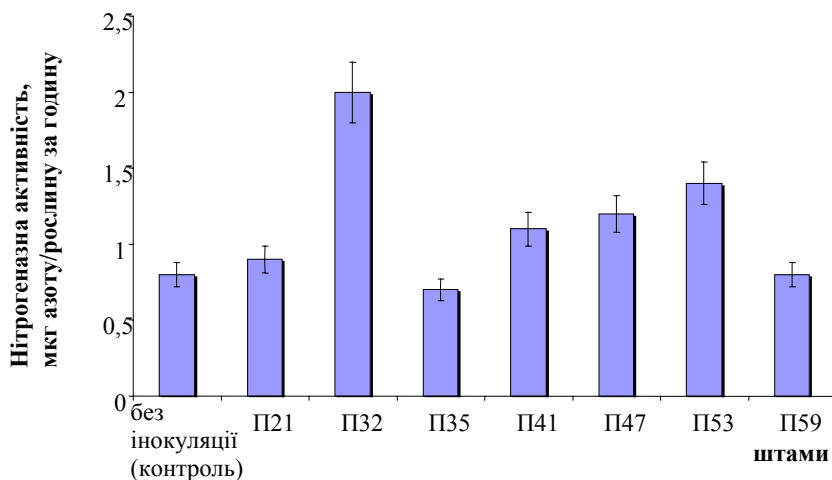


Рис. 4. Нітрогеназна активність псевдомонад в асоціації з рослинами пшениці ярої сорту Рання 93

Як свідчать дані, представлені на рис. 4, з виділених діазотрофів роду *Pseudomonas* лише чотири штами (*Pseudomonas* 12

sp П32, *Pseudomonas* sp П41, *Pseudomonas* sp П47 і *Pseudomonas* sp П53) сприяли збільшенню фіксації молекулярного азоту в кореневій зоні рослин пшениці ярої, тобто вони утворювали активні асоціативні системи із зазначеною культурою і за нітрогеназною активністю системи псевдомонади–пшениця яра не поступалися асоціативним системам азотобактер–пшениця яра та бацили–пшениця яра.

Що стосується діазотрофів роду *Flavobacterium*, то, використовуючи всі виділені штами, нам не вдалося забезпечити підвищення азотфіксувальної активності в кореневій зоні рослин, тобто, зазначені штами не здатні формувати активну асоціативну систему з пшеницею ярою (рис. 5).

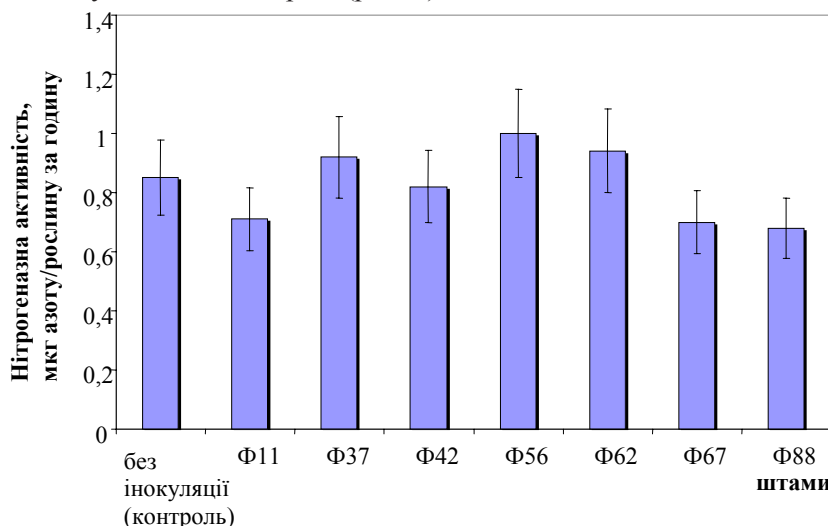


Рис. 5. Нітрогеназна активність флавобактерій в асоціації з рослинами пшениці ярої сорту Рання 93

На рис. 6 представлено здатність діазотрофів роду *Enterobacter* утворювати асоціації з пшеницею ярою і сприяти підвищенню нітрогеназної активності в кореневій зоні рослин.

Як свідчать одержані дані, з 9 штамів ентеробактера, які в чистій культурі характеризувалися високою активністю азотфіксації (від 2,2 до 4,7 2,8 мкг азоту на 1 мл живильного середовища за добу) три штами (*Enterobacter* sp. E18, *Enterobacter* sp. E80 і *Enterobacter* sp. E388) не були спроможні підвищити нітрогеназну активність в

кореневій зоні рослин пшениці ярої. Застосовуючи решту штамів, удалося сформувати асоціативну систему ентеробактер–пшениця яра, хоча активність цієї системи була невисокою (від 0,9 до 1,4 мкг азоту/рослину за годину) і поступалася асоціативним системам азотобактер–пшениця яра та бацили–пшениця яра.

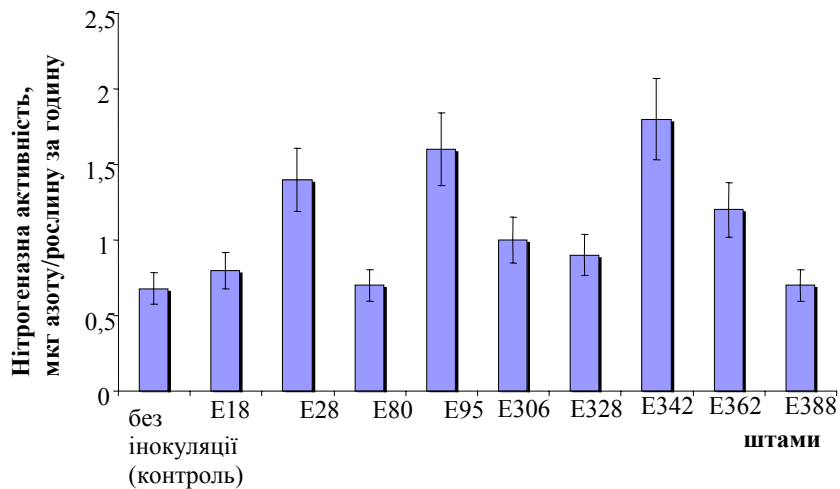


Рис. 6. Нітрогеназна активність ентеробактера в асоціації з рослинами пшениці ярої сорту Рання 93

Дослідження здатності азоспірил утворювати асоціативні системи з пшеницею ярою засвідчили, що діазотрофи роду *Azospirillum* є найактивнішими азотфіксаторами і їх інтродукція в кореневу систему рослин забезпечує формування активної асоціативної системи азоспірили–пшениця яра (рис. 7).

З даних, наведених на рис. 7, видно, що всі виділені штами азоспірил здатні формувати асоціативні системи з рослинами пшениці, нітрогеназна активність їх висока і коливається від 2,1 до 7,8 мкг азоту/рослину за годину. При цьому, як і у випадках з іншими діазотрофами, не спостерігається прямої залежності між активністю фіксації молекулярного азоту в чистій культурі і в асоціації з рослинами. Так, штам *Azospirillum sp.* 83, який у чистій культурі відзначався високою нітрогеназною активністю (10,4 мкг азоту на 1 мл живильного середовища за добу), в асоціації з рослинами пшениці ярої виявив найнижчу активність – 2,1 мкг

азоту/рослину за годину. Звертає на себе увагу штам *Azospirillum sp.* 102, який відзначався максимальною нітрогеназною активністю як у чистій культурі, так і в асоціації з рослинами.

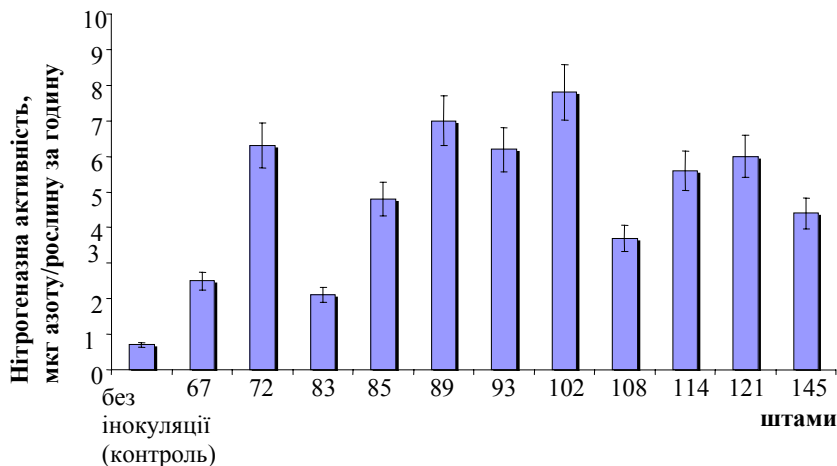


Рис. 7. Нітрогеназна активність азоспірил в асоціації з рослинами пшениці ярої сорту Рання 93

Таким чином, виділені з кореневої зони пшениці ярої діазотрофи родів *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* здатні формувати асоціативні системи з рослинами, з них найбільшою нітрогеназною активністю характеризуються асоціативні системи азоспірили–пшениця яра.

Отже, результати досліджень діазотрофів пшениці ярої показали, що в мікробних угрупованнях кореневої зони рослин зазначеного виду зберігається невичерпний генетичний потенціал діазотрофів і, використовуючи методи аналітичної селекції, можна одержати штамми, які за ефективністю будуть значно переважати існуючі біологічні агенти мікробних препаратів для підвищення урожайності злакових культур.

Аналізуючи дані літератури і результати вивчення азот-фіксувального угруповання кореневої зони рослин пшениці ярої, можна зробити висновок про те, що структура і функції комплексу діазотрофів кореневої зони сільськогосподарської культури (в нашому випадку – зернової культури), має свої особливості, але в

той же час певні групи діазотрофів притаманні всім дослідженим зерновим. Так, азотфіксувальні бактерії родів *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, які активно взаємодіють з рослинами, характерні не лише для кореневої зони рослин пшениці ярої, а й для ячменю ярого, тритикале ярого, пшениці озимої, жита озимого [3, 5–7].

Втім, певні особливості взаємодії діазотрофів з деякими зерновими культурами в системі мікро- і макроорганізм можна проілюструвати на прикладі ентеробактера і агробактерій.

В Україні створено низку бактеріальних препаратів, біо-агентами яких є асоціативні діазотрофи. Одним із таких препаратів є Ризоентерин, розроблений на основі штаму *Enterobacter aerogenes* 30ф. Цей штам, виділений з лучно-чорноземного ґрунту ризосфери рису (Краснодарський край), спочатку застосовували для підвищення урожайності рису [8], але ефективнішим виявилося застосування ризоентерину під ячмінь ярий. Польові досліді, проведені в багатьох областях України, засвідчили, що використання ентеробактера дозволяє підвищити урожайність ячменю, відмічено також значне посилення нітрогеназної активності в ризосфері інокульованих рослин [6].

Дослідження здатності штаму *E. aerogenes* 30ф приживатися в кореневій зоні рослин ячменю ярого показали, що бактерії колонізують ризосферний ґрунт і, особливо активно, ризоплану рослин, чим і можна пояснити успіхи інокуляції цієї культури ентеробактером [5]. У вегетаційних дослідіах з пшеницею ярою нами також показано ефективність інокуляції рослин активними штамми ентеробактера і здатність представників цього роду формувати активні асоціативні системи із зазначеною культурою.

У той же час, результати досліджень з озимими зерновими вказують на неефективність використання ентеробактера. Так, незважаючи на досить активну нітрогеназну активність у чистій культурі, представники роду *Enterobacter* не підвищували активність азотфіксації при взаємодії з житом озимим, тобто, вони не були здатні сформувати активну асоціативну систему з рослинами зазначеної сільськогосподарської культури і не проявляли на цій культурі ефективності [3]. Спроби застосувати Ризоентерин під

озиму пшеницю також показали, що хоча активність процесу фіксації молекулярного азоту в ризосфері інокульованих рослин дещо посилюється, але урожайність зерна і вміст білка залишаються на рівні контрольного варіанту [6].

Аналогічна картина спостерігається з таким перспективним асоціативним діазотрофом низки сільськогосподарських культур, як *Rhizobium radiobacter*. Відомо, що окремі штами представників цього виду здатні активно фіксувати молекулярний азот як у чистій культурі, так і в асоціації з рослиною [9, 10]. На основі ефективного штаму агробактерій розроблено мікробний препарат Діазофіт, рекомендований для інокуляції рису і пшениці [9]. Позитивну дію Діазофіту на зазначені культури показано в багатьох польових і виробничих дослідках у різних ґрунтово-кліматичних умовах [11]. Застосування певних штамів *Rhizobium radiobacter* сприяло підвищенню активності процесу фіксації молекулярного азоту в кореневій зоні рослин жита озимого і збільшенню продуктивності культури [3]. Втім, у дослідках з ячменем ярим не вдалося показати активного розвитку агробактерій у ризосфері рослин, а використання окремих штамів *Rhizobium radiobacter* не дозволило активізувати процес асоціативної азотфіксації [12].

Отже, позитивний результат аналітичної селекції діазотрофів і створення ефективних мікробно-рослинних асоціацій можливе лише за ретельного добору мікро- і макроорганізмів і системного вивчення всіх аспектів взаємодії азотфіксуючих бактерій з рослинами.

Підсумовуючи одержані результати, можна зробити наступні висновки. З кореневої зони рослин пшениці ярої, що вирощували на чорноземі вилугуваному, виділено 310 культур діазотрофів, які відзначалися високою здатністю до фіксації атмосферного азоту і належали до родів *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*. Встановлено, що виділені з кореневої зони рослин пшениці ярої діазотрофи були здатні формувати асоціативні системи з рослинами, з них найбільшою нітрогеназною активністю характеризувалися асоціативні системи азоспірили-пшениця яра.

1. Dobereiner J. Nitrogen fixation in grass bacteria associations in the tropics /Dobereiner J. //Isotopes biol. dinitrogen fixat. proc. – Vienna, 1978. – P. 51–68.

2. Калининская Т.А. Микрофлора семян риса как источник азотфиксирующих микроорганизмов в его ризосфере /Т.А. Калининская, Т.В. Редькина //Изв. АН СССР. Сер. Биол. – 1981. – № 4. – С. 617–621.

3. Надкернична О.В. Здатність діазотрофів до формування асоціативних систем з рослинами озимого жита /О.В. Надкернична //Агроекол. журн. – 2003. – № 3. – С. 17–20.

4. Bashan Y. *Azospirillum*–plant relationships: physiological, molecular, agricultural, end environmental advances (1997–2003) /Y. Bashan, G. Holguin, L. Bashan //Can. J. Microbiol. – 2004. – Vol. 50, N 8. – P. 521–557.

5. Копилов Є.П. Асоціативні азотфіксувальні бактерії ризосфери ярого ячменю /Є.П. Копилов //Живлення рослин: теорія і практика: Зб. наук. праць. – К.: Логос, 2005. – С. 315–327.

6. Патыка В.Ф. Роль азотфиксирующих микроорганизмов в повышении продуктивности сельскохозяйственных растений /В.Ф. Патыка, А.В. Калининченко, Ю.Т. Колмаз, М.В. Кислухина //Мікробіол. журн. – 1997. – Т. 59, № 4. – С. 3–14.

7. Шаховніна О.О. Вплив бактерій роду *Azospirillum* на потенційну нітрогеназну активність і біосинтетичні процеси в рослинах пшениці ярої та тритикале ярого /О.О. Шаховніна, О.В. Надкернична, Ю.О. Воробей, В.В. Кривопиша //С.-г. мікробіол: Міжвідомчий темат. наук. зб. – Чернігів, 2009. – Вип. 9. – С. 138–147.

8. А.с. 1356454 СССР, С12N1/20, С05F11/08. Штамм бактерий *Enterobacter aerogenes* – активный несимбиотический азотфиксатор под рис /О.А. Берестецкий, А.В. Ермолина, В.Ф. Патыка (СССР). – № 3876213; Заявл. 04.04.85; Опубл. 1.08.87.

9. А.с. 1621433 СССР, МКИ С05F 11/08, С12 N 1/20. Штамм бактерий *Agrobacterium radiobacter* для производства бактериального удобрения под рис и пшеницу /Н.К. Шерстобоев, А.В. Хотянович, В.Ф. Патыка (СССР). – Заявл. 28.09.88. – Без опубл.

10. Чумаков М.И. Новый ассоциативный диазотроф *Agrobacterium radiobacter* из гистосферы пшеницы /[М.И. Чумаков, В.В. Горбань, П.Е. Ковлер и др.] //Мікробіол. – 1992. – Т. 61, № 1.

– С. 92–102.

11. Біологічний азот /[Патика В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В. та ін.]; За ред. В.П. Патики. – К.: Світ, 2003. – 422 с.

12. Копилов Є.П. Бактерії роду *Azospirillum* як біоагенти препаратів для підвищення урожайності ярих колосових культур /Є.П. Копилов //Зб. наук. праць ННЦ «Інститут землеробства УААН». Спецвип. – К., 2006. – С. 161–168.

ДИАЗОТРОФЫ КОРНЕВОЙ ЗОНЫ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ЯРОВОЙ

Надкерничная Е.В., Копилов Е.П.

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, г. Чернигов

Из корневой зоны растений пшеницы яровой выделены активные азотфиксирующие бактерии родов: Azotobacter, Azospirillum, Bacillus, Flavobacterium, Enterobacter, Pseudomonas. Изучена способность diaзотрофов к формированию ассоциативных систем с пшеницей яровой. Наиболее существенное увеличение активности фиксации молекулярного азота в корневой зоне растений отмечено при использовании представителей рода Azospirillum.

Ключевые слова: *диазотрофы, пшеница яровая, асоциативная азотфиксация.*

NITROGEN FIXING BACTERIA OF SPRING WHEAT ROOT ZONE

Nadkernychna O.V., Kopylov E.P.

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture,
NAAS, Chernihiv

The paper presents the study of active nitrogen fixation bacteria of genera Azotobacter, Azospirillum, Bacillus, Flavobacterium, Enterobacter and Pseudomonas isolated from root zone of spring wheat plants. The ability of selected diazotrophs to form associative systems with spring wheat was investigated. The most significant increase of molecular nitrogen fixation activity in root zone of plants was observed under the Azospirillum species background.

Keywords: *nitrogen-fixing bacteria, spring wheat, associative nitrogen-fixing.*