

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДІАЗОТРОФА *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*, ВИДІЛЕНОГО З КОРЕНІВ ТРИТИКАЛЕ ЯРОГО

О. О. Шаховніна¹, О. В. Надкернична¹, В. М. Стрекалов¹, О. П. Тимошенко²

¹Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14035, Україна; e-mail: helenshah@ukr.net,

²Національний університет «Чернігівська політехніка»
вул. Шевченка, 95; м. Чернігів, 14035, Україна; e-mail: timosh_alena@ukr.net

Мета. Дослідити біологічні властивості діазотрофа *Azospirillum brasilense* 10/1, перспективного для покращення азотного живлення тритикале ярого та одержання урожаю високої якості. **Методи.** Штам азотфіксувальних бактерій *A. brasilense* 10/1 виділено з відмитих коренів тритикале ярого сорту Оберіг харківський методом накопичувальних культур за використання напіврідкого безазотного середовища Добрейнер. Азотфіксувальні мікроорганізми ізолювали на картопляний агар з буриштиною кислотою методом Дригальського. Потенційну нітрогеназну активність на відмитих коренях рослин тритикале ярого та азотфіксувальну активність азоспірил у чистій культурі визначали газохроматографічно. Електронімікроскопічні дослідження клітин бактерій проводили методом негативного контрастування ураніацетатом. Ідентифікацію азоспірил здійснювали на основі вивчення морфологічних, культуральних, фізіолого-біохімічних ознак та за використання молекулярно-генетичних методів (сиквенс-аналіз генів 16S рРНК). Нуклеотидні послідовності порівнювали з відповідними послідовностями, розміщеними у міжнародній базі даних GenBank NCBI за допомогою програми BLAST. Чутливість бактерій до антибіотиків і протруйників насіння зернових перевіряли диско-дифузійним методом. **Результати.** Методами аналітичної селекції одержано активний штам азотфіксувальних бактерій, ідентифікований як *Azospirillum brasilense* 10/1. Ідентичність послідовностей 16S рРНК *A. brasilense* 10/1 з референт-штамами *A. brasilense* у базі даних GenBank NCBI становить 99,5–99,6%. Діазотроф *A. brasilense* 10/1 чутливий до антибіотиків цефотаксиму, норфлоксацину, левоміцетину, гентаміцину, еритроміцину, канаміцину, фурадоніну, резистентний до поліміксину, ампіциліну, оксациліну, амоксициліну, ципрофлоксацину, цефтріаксону. Протруйники Вітавакс 200 ФФ і Фундазол не впливають на розвиток *A. brasilense* 10/1, Максим Стар 025 ФС децю інгібує розвиток бактерій. **Висновки.** Активний штам азотфіксувальних бактерій *A. brasilense* 10/1, виділений з відмитих коренів тритикале ярого методами аналітичної селекції, є перспективним інокулянтом для підвищення урожайності і покращення якості зерна зазначеної сільськогосподарської культури. *A. brasilense* 10/1 депоновано у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України за номером В-7317 і захищено патентом України № 104212.

Ключові слова: біологічна азотфіксація, асоціативні діазотрофи, *Azospirillum brasilense*, тритикале яре, нітрогеназна активність, антибіотики, фунгіциди, інокулянт.

Вступ. Біологічна азотфіксація, що здійснюється діазотрофними бактеріями, — явище планетарного масштабу, за рахунок якого був створений і підтримується азотний баланс ґрунтових, водних і повітряних екосистем [1].

Після відкриття здатності азотфіксувальних мікроорганізмів вступати в асоціації з небобовими рослинами були розпочаті й стрімко розвиваються дослідження асоціативної азотфіксації — саморегульованого процесу взаємодії азотфіксувальних прока-

ріот (бактерій і архей) з організмами-еукаріотами без утворення спеціалізованих морфологічних структур, але з істотним позитивним впливом на ріст і розвиток зазначених організмів [2]. Асоціативні діазотрофи представлено різними систематичними групами мікроорганізмів, які заселяють кореневі сфери рослин. З кореневої зони зернових культур виділено діазотрофи, здатні формувати тісні асоціації з відповідними видами рослин. Серед них представники родів *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Clostridium* та ін. [1]. Окрім фіксації атмосферного азоту, асоціативні бактерії покращують живлення рослин за рахунок підвищення використання мінерального азоту з ґрунту, синтезують низку біологічно активних речовин, що стимулюють ріст і розвиток кореневої системи, підвищують стійкість рослини до дії патогенів.

Результати дослідження біологічних властивостей асоціативного діазотрофа кореневої зони тритикале ярого, перспективного інокулянта зазначеної сільськогосподарської культури, наведено у цій статті.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Тритикале, або пшенично-житній амфідиплоїд, — перша штучно створена людиною культура. Її назва походить від латинських назв родів — пшениці (*Triticum*) та жита (*Secale*). З кожним роком інтерес виробників до цього хлібного злаку невпинно зростає. Культура має складний комплекс фізико-біологічних і хіміко-технологічних властивостей, що характеризують якість зерна та зеленої маси, і знаходить застосування у хлібопекарській, кондитерській, спиртовій, пивоварній промисловості та у виготовленні кормів для тварин [3–7].

Зерно тритикале має найвищу серед зернових поживну цінність за найнижчої собівартості [8]. За загальним вмістом білка (в середньому 14–16 %) і вмістом незамінної амінокислоти лізину (3,5–3,8 %) воно переважає зерно батьківських форм [3; 4; 7; 8]. Боршно новітніх сортів тритикале містить клейковину високої якості й використовується для приготування сортосумішок з пшеничним борошном низької якості з метою покращення його хлібопекарських властивостей [3].

За обмінною енергією тритикале прирівнюють до пшениці, ця культура формує вдвічі більший урожай зеленої маси, ніж пшени-

ця, й істотно перевищує за цим показником жито. Зелена маса має значну перевагу за вмістом протеїну, цукрів і каротиноїдів, що забезпечує вищий приріст маси тварин під час відгодівлі [4]. Крім цього, зерно тритикале містить удвічі менше, ніж жито, антипоживних речовин — алкілрезорцинолів [8].

Завдяки корисним властивостям (пластичності до умов вирощування), цінним біологічним особливостям (високій здатності засвоювати поживні елементи, підвищеній стійкості до заморозків, посухи, хвороб та шкідників) тритикале яре стало досить поширеною зерновою культурою в центральному та північному Степу, Лісостепу та Поліссі України [3; 9].

Генетико-селекційні роботи з покращення властивостей сучасних сортів зернових культур, зокрема тритикале ярого, враховують такі ознаки, як урожайність та основні елементи структури урожаю, фізико-хімічні властивості зерна, стійкість рослин до хвороб і шкідників, толерантність до несприятливих абіотичних чинників тощо [5, 10–12]. Проте така важлива властивість, як здатність утворювати ефективні асоціації з ґрунтовими діазотрофами, зазвичай не враховується.

Одними з найактивніших і найбільш досліджених азотфіксувальних бактерій, що стимулюють ріст і розвиток рослин (Plant Growth Promotion Rhizobacteria), є представники роду *Azospirillum* [13; 14], їх взаємодія з небобовими рослинами розглядається науковцями як загальна модель рослинно-мікробних взаємодій [15]. Азоспірили характеризуються низкою позитивних впливів на ріст і розвиток рослин, серед яких найбільш визначальними є здатність до фіксації молекулярного азоту, синтез фітогормонів, вітамінів, речовин антибіотичної та антифунгальної природи [16]. З літературних джерел відомо, що набагато успішніше відбувається інтродукція в кореневу зону рослин тих штамів мікроорганізмів, що були ізольовані з ризоплани або ризосфери відповідного ботанічного виду [17].

З огляду на вищезазначене, метою нашої роботи було дослідити біологічні властивості діазотрофа *A. brasilense* 10/1, потенційно перспективного для покращення азотного живлення тритикале ярого та одержання урожаю високої якості.

Матеріали та методи досліджень. Штам азотфіксувальних бактерій *A. brasilense* 10/1 виділено з відмитих коренів тритикале ярого сорту Оберіг харківський, який відзначався не лише високою активністю нітрогенази, але й найнижчою варіабельністю цього показника серед усіх досліджуваних сортів за 4 роки досліджень [18]. Виділення проводили методом накопичувальних культур, для чого використовували напіврідке безазотне середовище Доберейнер з органічним джерелом енергії — бурштиновою кислотою.

Рослини тритикале ярого вирощували на чорноземі вилугуваному (рН — 6,0; вміст гумусу — 3,5 %; азоту, що легко гідролізується (за Корнфільдом), — 95 мг; рухомих форм фосфору (P₂O₅) (за Кирсановим) — 251 мг; обмінного калію (K₂O) (за Кирсановим) — 108 мг на 1 кг).

Подрібнені корені рослин інкубували за температури 28 °С протягом 3 діб у флаконах місткістю 40 см³ з живильним середовищем. За три доби, після появи білої зануреної плівки, флакони герметизували, вводили ацетилен (10 % від об'єму газової фази у флаконі) та інкубували ще упродовж доби. Після закінчення строку інкубації зразки аналізували на газовому хроматографі «Chrom-4» з полум'яно-іонізаційним детектором. Колонка довжиною 370 см — заповнена хромосорбом з β'-β'-оксидіпропіонітрилом. Температура термостату — 50 °С, газ-носії — азот, витрата газів (в мл/хвилину): водню — 30, азоту — 100, повітря — 500 [19].

Готували суспензії бактеріальних плівок у стерильній водогінній воді тих зразків, які показали найвищі значення потенційної нітрогеназної активності, визначеної за відновленням ацетилену до етилену. Ізоляти азотфіксувальних мікроорганізмів виділяли на картопляний агар з бурштиновою кислотою методом Дригальського [20].

Ідентифікацію виділених культур проводили на основі вивчення морфологічних (світлова, електронна мікроскопія), культуральних, фізіолого-біохімічних ознак за визначником Берджі [21] та за використання молекулярно-генетичних методів (сиквенс-аналіз генів 16S рРНК). Серед всіх виділених бактерій роду *Azospirillum* методами аналітичної селекції відібрано штам, який характеризувався найвищою азотфіксувальною активністю як у чистій культурі, так і в асо-

ціації з рослинами тритикале [22].

Електронномікроскопічні дослідження клітин бактерій проводили методом негативного контрастування ураніацетатом. Використовували 3-добові культури, вирощені на скосах картопляного агару. Бактеріальну масу на кінчику мікробіологічної петлі суспендували у краплі стерильної води. На мідні опорні решітки з формваровою плівкою-підкладкою наносили суспензію клітин і витримували їх протягом 3 хвилин. Контрастування проводили також упродовж 3 хвилин. Надлишок рідини видаляли за допомогою фільтрувального паперу та висушували на повітрі. Клітини азоспірил проглядали в електронному мікроскопі EM-125 (Україна) за інструментального збільшення ×15 000.

Сиквенс-аналіз послідовностей 16S рРНК досліджуваного штаму проводили в Українській лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Для виділення сумарної ДНК використовували набір «ДНК-сорб В» згідно з протоколом виробника.

Для полімеразної ланцюгової реакції застосовували універсальні праймери: рА 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 (8–27) та рА 5-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3 (1542–1523). Робоча концентрація праймерів становила 5 пМ/мкл.

Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі GeneAmp PCR System 2720. Реакційна суміш для ПЛР складалася з 5 мкл ПЛР-буферу, 2,5 мкл дНТФ, 1 мкл суміші праймерів, 0,2 мкл *Taq* ДНК-полімерази і 1 мкл зразка ДНК.

ПЛР проводили в такий спосіб: первинна денатурація 95 °С — 3 хв., далі 30 циклів (95 °С — 30 с, 55 °С — 30 с, 72 °С — 2 хв.), кінцева елонгація — 72 °С — 10 хв. ПЛР-продукти розділяли за допомогою горизонтального електрофорезу в 1,5 % агарозі з ТЕ-буфером і додаванням 75 мкг бромистого етидію.

Для екстрагування продуктів ПЛР з агарозного гелю вирізані фрагменти, що містили ДНК, поміщали в пробірки на 1,5 мл і додавали 500 мкл лізуючого розчину та інкубували 5 хв. за температури 65 °С, а потім центрифугували протягом 1 хв. за 4000 об./хв. Супернатант видаляли. Осад промивали послідовно розчинами № 1 та № 2 і видаляли за-

лишки розчину центрифугуванням протягом 1 хв. за 14 000 об./хв.

Нуклеотидні послідовності отриманих ПЛР-продуктів визначали на автоматичному секвенаторі ABI Prism 3130 (“Applied Biosystems”, США). Одержані послідовності порівнювали з послідовностями міжнародної бази даних GenBank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/) за допомогою програми BLAST.

Чутливість до антибіотиків і протруйників насіння зернових перевіряли диско-дифузійним методом [23].

Експериментальні дані статистично оброблено з використанням пакета прикладних програм Microsoft Office та представлено як середні значення та їх похибки.

Результати досліджень. Відібраний штам *Azospirillum* sp. 10/1 характеризується такими морфолого-культуральними властивостями: добре росте за температури 28–30 °С, рН 6,8–7,6 на агаризованому живильному середовищі такого складу: бурштинова кислота — 2,5 г/л, калію гідроксид — 2 г/л, агар-агар порошковий — 14,0 г/л, картопля — 200 г/л, рН 7,0. Стерилізація — 1 атм. 30 хв. За три доби на картопляному агарі утворюються білі круглі колонії діаметром 3–5 мм. Після старіння колонії набувають перламутрового блиску і накопичують рожевий пігмент, який не дифундує у середовище (рис. 1 а). За таких умов культивування *A. brasilense* 10/1 не дисоціює на R- і S-фор-

ми. За додавання 0,5 % D-глюкози у середовище утворюють великі білі колонії зі зморшкуватими краями (рис. 1 б).

На безазотному напіврідкому середовищі Доберейнер спостерігається ріст у вигляді плівки під поверхнею і активна фіксація молекулярного азоту. Нітрогеназна (ацетилен-відновлювальна) активність становить 8,62–10,92 мкг азоту на 1 мл середовища за 1 добу. На агаризованому середовищі Доберейнер утворюють дрібні, складчасті колонії, на середовищі Касераса — дрібні колонії червоного кольору. Клітини мають форму рухливих, дещо зігнутих паличок розміром 1,0–1,2 × 1,8–2,5 мкм (рис. 2), грамнегативні.

Досліджувана культура не утворює спор. Під час руху форма клітин S-подібна. Досліджуваний штам є аеробом, але краще розвивається за мікроаерофільних умов. Оптимум росту спостерігається за рН 6,8–7,6 і температури 28–30 °С. Не потребує біотину.

Каталазо-оксидазопозитивний. Не розріджує желатину. Молоко з лакмусом не підлюговує і не підкисляє. Пептонізації молока не спостерігається.

Як свідчать дані літератури, в ґрунтах зони помірного клімату з описаних сьогодні видів азоспірил трапляються переважно *A. brasilense* та *A. lipoferum* [21]. Згідно з даними, наведеними у визначнику Берджі, діагностичними ознаками, які дають змогу розмежувати зазначені види, є потреба *A. lipo-*



а)

б)

Рис. 1. Колонії *Azospirillum* sp. 10/1, 72 год. культивування:

а) картопляний агар з 2,5 % бурштинової кислоти;

б) картопляний агар з 2,5 % бурштинової кислоти та 0,5 % D-глюкози.



Рис. 2. *Azospirillum* sp. 10/1. Поділ клітини. Картопляний агар, 72 год. культивування, $\sim \times 15\,000$, забарвлено уранілацетатом.

ferum у біотині та їх здатність використовувати глюкозу та маніт як єдине джерело вуглецевого живлення, на відміну від *A. brasilense*.

За додавання суспензії клітин досліджуваного штаму *Azospirillum* sp. 10/1 до рідкого середовища з мінеральними солями, бромтимолом і глюкозою з наступним інкубуванням за температури 28 °С упродовж 5 діб було відзначено підвищення оптичної густини розчину (D_{665}) у 4,2 раза та зниження його рН до 6,7 (табл. 1).

Як свідчать дані, наведені у табл. 1, бактерії *Azospirillum* sp. 10/1 здатні розвиватися за використання глюкози як єдиного джерела вуглецю, що може вказувати на їх належність до виду *A. lipoferum*. Втім, той факт, що досліджуваний штам не потребував біотину і не розвивався на середовищі з додаванням маніту, може свідчити про його належність до виду *A. brasilense*.

З метою уточнення таксономічного положення *Azospirillum* sp. 10/1 здійснювали сиквенс-аналіз генів 16S рРНК зазначеного штаму. За використання універсальних бактеріальних праймерів одержано продукти ампліфікації розміром ~ 1500 п. н. (рис. 3).

Таблиця 1. Розвиток *Azospirillum* sp. 10/1 за використання глюкози та маніту як єдиного джерела вуглецевого живлення

Варіанти	D_{665}	pH
Контроль (середовище з глюкозою або манітом без суспензії клітин)	$0,015 \pm 0,000$	7,1
Контроль (суспензія клітин без джерела вуглецю)	$0,024 \pm 0,002$	7,1
Середовище з глюкозою	$0,100 \pm 0,000$	6,7
Середовище з манітом	$0,021 \pm 0,001$	6,9

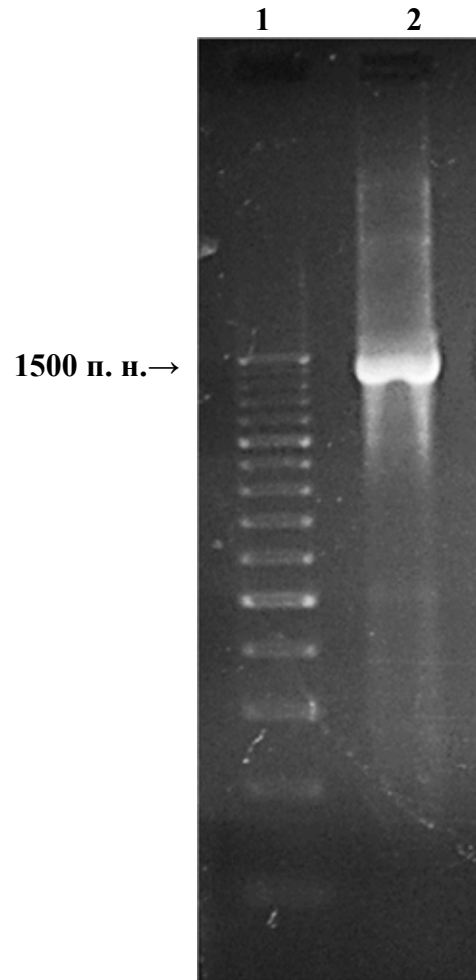


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації гена 16S рРНК штаму *Azospirillum* sp. 10/1:

1 — маркерна ДНК, 2 — штам 10/1.

Порівняльний аналіз цього фрагмента з аналогічними послідовностями бактерій *A. brasilense* та *A. lipoferum* із бази даних GenBank, засвідчив, що досліджуваний штам генетично близький до виду *A. brasilense* (табл. 2). Так, ідентичність послідовностей 16S рРНК *Azospirillum* sp. 10/1 з референт-штамами *A. brasilense* досить висока і становить 99,5–99,6 %, тоді як ідентичність з референт-штамами, що належать до виду *A. lipoferum*, не перевищує 96,7 %.

Таблиця 2. Ідентичність сиквенованого фрагменту 16S рРНК *Azospirillum* sp. 10/1 з сиквенсами референс-штамів *Azospirillum*, що зберігаються в GenBank

Назва виду і номер референс-штаму в нуклеотидній базі GenBank	Довжина фрагменту 16S рРНК, що порівнюється	Ідентичність послідовностей, %
<i>Azospirillum brasilense</i> Gr 66	1362	99,5
<i>A. brasilense</i> Gr 22	1362	99,6
<i>A. brasilense</i> Gr 27	1362	99,6
<i>A. brasilense</i> ISSDS-858	1362	99,6
<i>A. brasilense</i> ISSDS-855	1362	99,6
<i>Azospirillum</i> sp. 7C	1362	98,9
<i>A. lipoferum</i> B22	1251	96,7
<i>A. lipoferum</i> B21	1251	96,7
<i>A. lipoferum</i> 64	1229	96,0
<i>A. lipoferum</i> A5	1229	95,9
<i>A. lipoferum</i> 59B	1206	95,8

Отже, враховуючи результати молекулярно-генетичного аналізу, ми віднесли досліджуваний штам до виду *A. brasilense*.

A. brasilense 10/1 депоновано у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України за номером В-7317 і захищено патентом України № 104212 як штам бактерій, що може бути біоагентом мікробного препарату для підвищення урожайності зерна тритикале ярого та поліпшення його якості [24].

Оскільки бактерії-біоагенти мікробних препаратів, які використовують для інокуляції зернових культур, за висіву насіння в

грунт вступають у конкурентні відносини з іншими видами мікроорганізмів і підпадають під вплив антибіотичних речовин, що ними виділяються, важливим було перевірити чутливість *A. brasilense* 10/1 до антибіотиків (рис. 4).

Встановлено, що *A. brasilense* 10/1 чутливий до антибіотиків цефотаксиму, норфлуксацину, левоміцетину, гентаміцину, еритроміцину, канаміцину, фурадоніну, резистентний до поліміксину, ампіциліну, оксациліну, амоксициліну, ципрофлоксацину, цефтріаксону. Цефалексин здійснює бактеріостатичний вплив на штам.

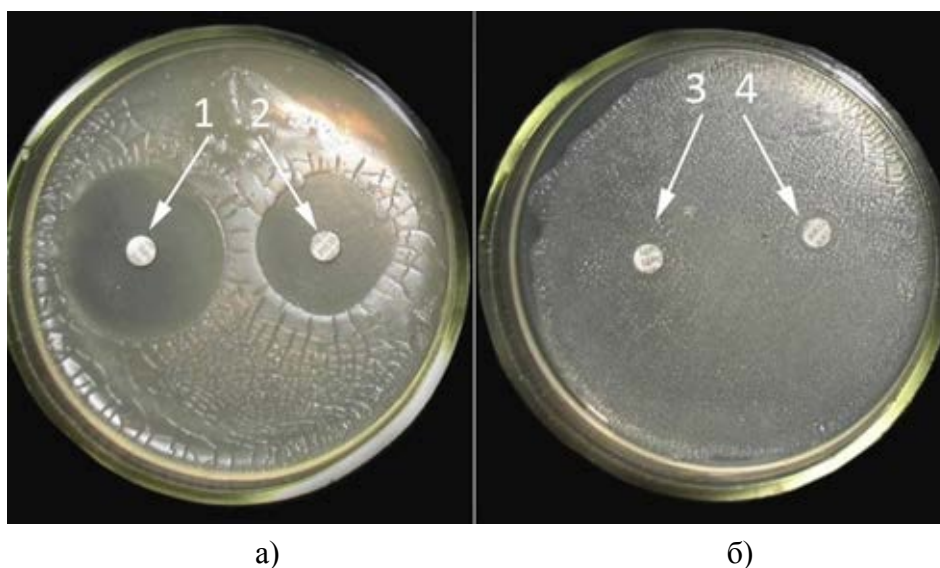


Рис. 4. Вплив антибіотиків на азотфіксувальні бактерії *A. brasilense* 10/1: а) чутливість до еритроміцину (1) та левоміцетину (2); б) резистентність до ципрофлоксацину (3) та амоксициліну (4).

З огляду на те, що *A. brasilense* 10/1 може бути перспективним для передпосівної інокуляції насіння, а сучасні технології вирощування зернових культур передбачають поверхневу обробку насіння протруйниками, перевіряли вплив фунгіцидів Максим Стар 025 ФС, Вітавакс 200 ФФ та Фундазол на досліджуваний штам бактерій (рис. 5).

Як видно з рисунку, протруйники Вітавакс 200 ФФ і Фундазол не впливають на розвиток діазотрофа *A. brasilense* 10/1, Максим Стар 025 ФС дещо інгібує його розвиток.

Висновки. З відмитих коренів тритикале ярого сорту Оберіг харківський, який характеризується високою потенційною нітрогеназною активністю в кореневій зоні, виділено штам азотфіксувальних бактерій *A. brasilense* 10/1, досліджено його біологічні властивості.

A. brasilense 10/1 депоновано у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України за номером В-7317 і захищено патентом України № 104212. Штам може бути перспективним для створення на його основі мікробного препарату для підвищення урожайності й покращення якості зерна тритикале ярого.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Коць С. Я., Моргун В. В., Патица В. П., Петриченко В. Ф., Надкєрничная Е. В., Кириченко Е. В. Биологическая фиксация азота: [монография в 4-х т.]. Т. 4: Ассоциативная азотфиксация. К. : Логос. 2014. 412 с.

2. Умаров М. М. Азотфиксация в ассоциациях организмов. *Проблемы агрохимии и экологи*

гии. 2009. № 2. С. 22–26.

3. Білітюк А. П. Культура, що збільшує рентабельність: пшениця + жито = тритикале. *Агроном*. 2007. № 11. С. 96–101.

4. Максимов М. Г. Тритикале як кормова культура та його вітчизняні сорти. *Агроном*. 2006. № 3. С. 30–34.

5. Рябчун В. К., Мельник В. С., Капустіна Т. Б., Щеченко О. Є. Урожайність тритикале ярого та її стабільність залежно від генотипу та умов середовища. *Селекція та насінництво*. 2016. № 1 (30). С. 37–44.

6. Glamoclija N., Starcevic M., Ciric J., Sefer D., Glisic M., Baltic M. Z., ... Glamoclija D. The importance of triticale in animal nutrition. *Veterinary Journal of Republic of Srpska*. 2018. Vol. 18, № 1. P. 73–94. <https://doi.org/10.7251/VETJEN1801073G>

7. Mergoum M., Singh P. K., Pena R. J., Lozano-del Rio A. J., Cooper K. V., Salmon D. F., Gomez Macpherson H. Triticale: a «new» crop with old challenges. M. J. Carena (Ed.). *Cereals*. Springer Science + Business Media, LLC, 2009. P. 267–287. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72297-9_9

8. Гриб С. И., Булавина Т. М., Буштевич В. Н., Хатетовский Ю. Ф. Тритикале — ценная зернофуражная культура. *Вестник семеноводства в СНГ*. 2002. № 1. С. 17–19.

9. Рябчун В. К., Шагохін В. І., Лісничий В. А., Капустіна Т. Б. Яре тритикале для стабільного виробництва зерна. X. : Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва, 2007. 16 с.

10. Любич В. В., Новіков В. В. Порівняльна характеристика технологічних властивостей зерна тритикале озимого та пшениці озимої. *Зернові продукти і комбікорми*. 2015. Т. 60, № 4. С. 14–18.

11. Blum A. The abiotic stress response and adaptation of triticale — a review. *Cereal Research Communications*. 2014. Vol. 42, № 3. P. 359–375. <https://doi.org/10.1556/CRC.42.2014.3.1>

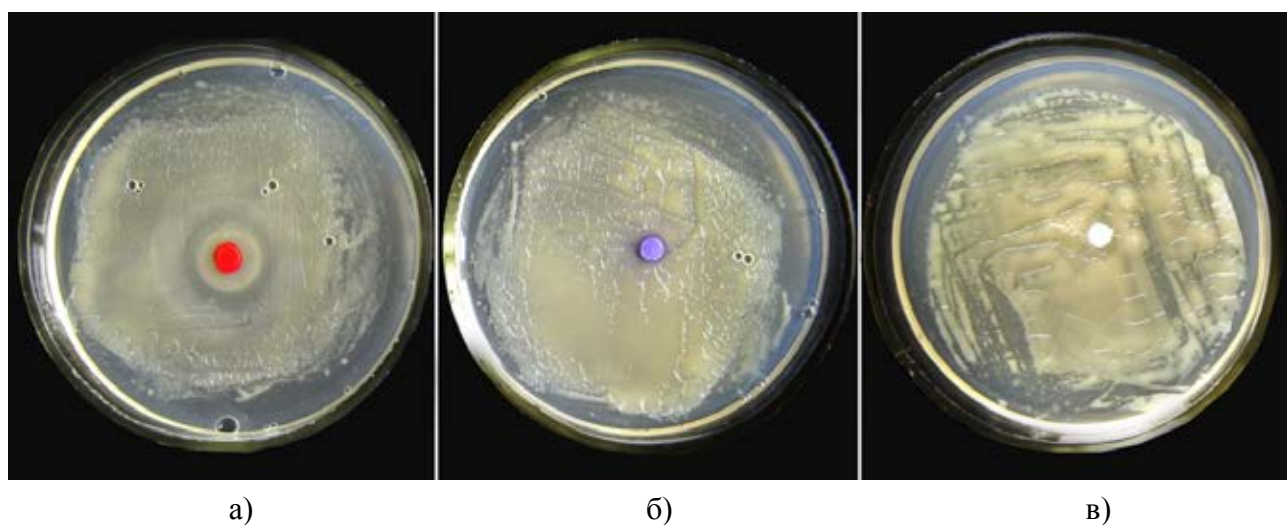


Рис. 5. Вплив протруйників насіння на азотфіксувальні бактерії *A. brasilense* 10/1: а) Максим Стар 025 ФС; б) Вітавакс 200 ФФ; в) Фундазол.

12. Гриб С. И., Булавина Т. М., Буштевич В. Н. Формирование урожайности зерна тритикале ярового в зависимости от сорта и приемов технологии возделывания в условиях Беларуси. *Инновационные сорта и технологии возделывания ярового тритикале*. Коллективная монография. Владимир : Изд-во ПресСто, 2017. С. 159–201.
13. Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L. E. *Azospirillum* – plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Canadian Journal of Microbiology*. 2004. Vol. 50, № 8. P. 521–577.
14. Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M. L., Touraine B., Moëgne-Loccoz Y., Muller D. ... Prigent-Combaret C. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*. 2013. № 4. P. 356. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>
15. Pereg L., de-Bashan L. E., Bashan Y. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. *Plant and Soil*. 2016. Vol. 399. P. 389–414. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2778-9>
16. Cohen A. C., Bottini R., Pontin M., Berli F. J., Moreno D., Boccanlandro H. ... Piccoli P. N. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiologia Plantarum*. 2015. Vol. 153. P. 79–90. <https://doi.org/10.1111/ppl.12221>
17. Белимов А. А., Иванчиков А. Ю., Юдкин Л. Ю., Хамова О. Ф., Поставская С. М., Поползухина П. В. ... Козлова Г. Я. Характеристика и интродукция новых штаммов ассоциативных ростстимулирующих бактерий, доминирующих в ризоплане проростков ячменя. *Микробиология*. 1999. Т. 68. С. 392–397.
18. Шаховніна О. О. Фіксація молекулярно-азоту у кореневій зоні перспективних вітчизняних сортів тритикале ярого. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2010. Вип. 12. С. 181–192.
19. Волкогон В. В., Надкернична О. В., Токмакова Л. М., Мельничук Т. М., Чайковська Л. О. Експериментальна ґрунтова мікробіологія: монографія / за наук. ред. В. В. Волкогона. К. : Аграрна наука, 2010. 464 с.
20. Воробей Ю. О., Романова І. М., Усманова Т. О. Методи виділення бактерій роду *Azospirillum* з кореневої зони рослин : науково-практичні рекомендації. Чернігів : ІСМАВ НААН, 2018. 30 с.
21. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. Vol. 2. The Proteobacteria / Eds. D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley. Springer-Verlag, New York, 2005. 1388 p.
22. Патица В. П., Надкернична О. В., Шаховніна О. О. Вплив *Azospirillum brasilense* 10/1 на асоціативну азотфіксацію і внутрішньосортовий поліморфізм тритикале ярого. *Мікробіологічний журнал*. 2015. Т. 77, № 5. С. 29–36.
23. Гаркавенко Т. О., Неволько О. М., Козицька Т. Г., Ординська Д. О., Меженська Н. А. Методичні вказівки щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів. К. : ДНДІЛДВСЕ, 2014. С. 19–24.
24. Штам бактерій *Azospirillum brasilense* для інокуляції насіння тритикале ярого: пат. 104212 С2 Україна. МПК С12N 1/20 (2006.01) С12R (2006.01) С05F11/08 (2006.01), О. В. Надкернична, О. О. Шаховніна, М. А. Ушакова; заявник і патентовласник: Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН України. № а 2012 03817; заявл. 29.03.2012; опубл. 10.01.2014, Бюл. № 1.

Отримано 27.08.2020

<https://doi.org/10.35868/1997-3004.32.48-57>

UDC 579.64:631.461.5:633.19

BIOLOGICAL PROPERTIES OF DIAZOTROPH *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* ISOLATED FROM SPRING TRITICALE ROOTS

O. O. Shakhovnina¹, O. V. Nadkernychna¹, V. M. Strekalov¹, O. P. Tymoshenko²

¹Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv
e-mail: helenshah@ukr.net

²Chernihiv Polytechnic National University, Chernihiv; e-mail: timosh_alena@ukr.net

Objective. Study the biological properties of the diazotroph *Azospirillum brasilense* 10/1, promising for improving the nitrogen nutrition of spring triticale and obtaining a high quality crop. **Methods.** A strain of nitrogen-fixing bacteria *A. brasilense* 10/1 isolated from washed roots of

spring triticale Oberih Kharkivskiyi by accumulation cultures method using Dobreiner semi-liquid nitrogen-free medium. Nitrogen-fixing microorganisms were isolated on potato agar with succinic acid by the Dryhalsky method. Potential nitrogenase activity on washed roots of spring triticale plants and nitrogen-fixing activity of azospirilla in pure culture were measured by gas chromatography. Electron microscopic studies of bacterial cells were performed by the method of negative contrast with uranyl acetate. Identification of azospirilla was carried out on the basis of the study of morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics and using molecular genetic methods (16S rRNA sequence analysis). The nucleotide sequences were compared with the corresponding sequences from the international database GenBank NCBI using BLAST software. The sensitivity of bacteria to antibiotics and cereal seed pesticides was tested by disk diffusion method. **Results.** The active strain of nitrogen-fixing bacteria, identified as *Azospirillum brasilense* 10/1, was obtained by analytical selection methods. The identity of the sequences of 16S rRNA of *A. brasilense* 10/1 with reference strains of *A. brasilense* in the GenBank NCBI database is 99.5 % to 99.6 %. Diazotroph *A. brasilense* 10/1 is sensitive to cefotaxime, norfloxacin, chloramphenicol, gentamicin, erythromycin, kanamycin, furadonin, resistant to polymyxin, ampicillin, oxacillin, amoxicillin, ciprofloxacin, ceftriaxone. Vitavax 200FF and Fundazole dressers do not affect the development of *A. brasilense* 10/1, Maxim Star 025 FS somewhat inhibits the development of bacteria. **Conclusion.** The active strain of nitrogen-fixing bacteria *A. brasilense* 10/1 isolated from washed roots of triticale by methods of analytical selection, is a promising inoculant to increase yields and improve grain quality of this crop. *A. brasilense* 10/1 is deposited in the Depository of the Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine under number B-7317 and is protected by the patent of Ukraine No. 104212.

Keywords: biological nitrogen fixation, associative diazotrophs, *Azospirillum brasilense*, spring triticale, nitrogenase activity, antibiotics, fungicides, inoculant.

REFERENCES

1. Kots, S. Ya., Morhun, V. V., Patyka, V. F., Petrichenko, V. F., Nadkernichnaya, Ye. V., & Kirichenko, Ye. V. (2014). *Assotsiativnaya azotifikatsiya* [Associative nitrogen fixation]. *Biologicheskaya fiksatsiya azota* [Biological nitrogen fixation]. Monograph in 4 volumes. Vol. 4. Kiev: Lohos [In Russian].
2. Umarov, M. M. (2009). Azotifikatsiya v assotsiativnykh organizmakh [Nitrogen fixation in associations of the organisms]. *Problemy agrokhimii i ekologii — Problems of agrochemistry and ecology*, 2, 22–26 [In Russian].
3. Bilitiuk, A. P. (2007). Kultura, shcho zbilshuie rentabelnist: pshenytsia + zhyto = trytykale [Crop which increases profitability: wheat + rye = triticale]. *Ahronom — Agronomist*, 11, 96–101. [In Ukrainian].
4. Maksymov, M. H. (2006). Trytykale yak kormova kultura ta yoho vitchyzniani sorty [Triticale as a fodder crop and its native varieties]. *Ahronom — Agronomist*, 3, 30–34 [In Ukrainian].
5. Riabchun, V. K., Melnyk, V. S., Kapustina, T. B., & Shchechenko, O. Ye. (2016). Urozhainist trytykale yarohto ta yii stabilnist zalezho vid henotypu ta umov seredovyschcha [Spring triticale yield and its stability depending on the genotype and environmental conditions]. *Selektsiia ta nasinnystvo — Selection and Seed Industry*, 1 (30), 37–44 [In Ukrainian].
6. Glamoclija, N., Starcevic, M., Ciric, J., Sefer, D., Glisic, M., Baltic, M. Z. ... Glamoclija, D. (2018). The importance of triticale in animal nutrition. *Veterinary Journal of Republic of Srpska*, 18 (1), 73–94. <https://doi.org/10.7251/VETJEN1801073G>
7. Mergoum, M., Singh, P. K., Pena, R. J., Lozano-del Rio, A. J., Cooper, K. V., Salmon, D. F., & Gomez Macpherson, H. (2009). Triticale: a «new» crop with old challenges. In M. J. Carena (Ed.). *Cereals* (pp. 267–287). Springer Science + Business Media, LLC https://doi.org/10.1007/978-0-387-72297-9_9
8. Hrib, S. I., Bulavina, T., M., Bushtevich, V. N., & Khatetovskii, Yu.F. (2002). Tritikale — tsennaya zernofurazhnaya kultura [Triticale — a valuable fodder grain]. *Vestnik semenovodstva v SNG — Bulletin of Seed Production in CIS countries*, 1, 17–19. [In Russian].
9. Riabchun, V. K., Shatokhin, V. I., Lisnychyi, V. A., & Kapustina, T. B. (2007). Yare trytykale dlia stabilnoho vyrobnytstva zerna [Spring triticale for stable production of grains]. Kharkiv: Plant Production Institute named after V. Ya. Yuriev [In Ukrainian].
10. Liubych, V. V., & Novikov, V. V. (2015). Porivnialna kharakterystyka tekhnolohichnykh vlastyvostei zerna trytykale ozymoho ta pshenytsi ozymoï [Comparative characteristics of grain tritikale and winter wheat]. *Zernovi produkty i kombikormy — Cereals and mixed feeds*, 60 (4), 14–18 [In Ukrainian].

11. Blum, A. (2014). The abiotic stress response and adaptation of triticale — a review. *Cereal Research Communications*, 42 (3), 359–375. <https://doi.org/10.1556/CRC.42.2014.3.1>
12. Hrib, S. I., Bulavina, T. M., & Bushevich, V. N. (2017). Formirovanie urozhaynosti zerna tritikale yarovogo v zavisimosti ot sorta i priemov tekhnologii vzdelyvaniya v usloviyakh Belarusi [Formation of grain yield of spring triticale depending on the variety and techniques of cultivation technology in Belarus]. *Innovatsionnye sorta i tekhnologii vzdelyvaniya yarovogo triticale — Innovative varieties and technologies of cultivation of spring triticale*. Vladimir: PresSto [In Russian].
13. Bashan, Y., Holguin, G., & de-Bashan, L. E. (2004). *Azospirillum* – plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50(8), 521–577.
14. Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D. ... Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4, 356. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>
15. Pereg, L., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2016). Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. *Plant and Soil*, 399, 389–414. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2778-9>
16. Cohen, A. C., Bottini, R., Pontin, M., Berli, F. J., Moreno, D., Boccanlandro, H. ... Piccoli, P. N. (2015). *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiologia Plantarum*, 153, 79–90. <https://doi.org/10.1111/ppl.12221>
17. Belimov, A. A., Ivanchikov, A. Yu., Yudkin, L. Yu., Khamova, O. F., Postavskaya, S. M., Popolzhukhina, P. V. ... Kozlova, G. Ya. (1999). Kharakteristika i introduktsiya novykh shtammov assotsiativnykh rodstimuliruyushchikh bakteriy, dominiruyushchikh v rizoplane prorostkov yachmenya [New strains of associative growth-stimulating bacteria dominating the rhizoplane of barley seedlings: characterization and introduction]. *Mikrobiologiya — Microbiology*, 68, 392–397 [In Russian].
18. Shakhovkina, O. O. (2010). Fiksatsiia molekuliarnoho azotu u korenevii zoni perspektyvnykh vitchyznianykh sortiv trytykale yaroho [Ability to associative nitrogen fixation of perspective national varieties of spring triticale]. *Silskohospodarska mikrobiologhiia — Agricultural Microbiology*, 12, 181–192 [in Ukrainian].
19. Volkohon, V. V., Nadkernychna, O. V., Tokmakova, L. M., Melnychuk, T. M., & Chaikovska, L. O. (2010). Eksperymentalna gruntova mikrobiologhiia : monohrafiia [Experimental soil microbiology : monograph]. V. V. Volkohon (Ed.). Kyiv: Ahrarna nauka [in Ukrainian].
20. Vorobei, Yu. O., Romanova, I. M., & Usmanova, T. O. (2018). Metody vydilennia bakterii rodu *Azospirillum* z korenevoi zony roslyn: nauko-vo-praktychni rekomendatsii [Separating of the *Azospirillum* genus bacteria from the root zone of the plants]. Chernihiv: ISMAV NAAN [in Ukrainian].
21. Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. (Eds.). (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. The Proteobacteria. New York: Springer-Verlag.
22. Patyka, V. P., Nadkernychna, O. V., & Shakhovkina, O. O. (2015) Vplyv *Azospirillum brasilense* 10/1 na asotsiatyvnu azotfiktsatsiiu i vnutrishnosortovyi polimorfizm trytykale yaroho [Influence of *Azospirillum brasilense* 10/1 on associative nitrogen fixation and intravarietal polymorphism of spring triticale]. *Mikrobiologichnyi zhurnal — Microbiology Journal*, 77 (5), 29–36 [in Ukrainian].
23. Harkavenko, T. O., Nevolko, O. M., Kozytska, T. H., Ordynska, D. O., & Mezhenka, N. A. (2014). Vyznachennia chutlyvosti mikroorhanizmiv do antybakterialnykh preparativ [Determining the sensitivity of microorganisms to antibiotics]. Guidance. Kiev: SSRILDVSE [in Ukrainian].
24. Nadkernychna, O. V., Shakhovkina, O. O., Ushakova, M. A. Patent no. 104212 C2 Ukraine IPC C12N 1/20 (2006.01) C12R (2006.01) C05F11/08 (2006.01). Shtam bakterii *Azospirillum brasilense* dlia inokuliatsii nasinnia trytykale yaroho [Bacterial strain *Azospirillum brasilense* for inoculation of spring triticale seeds]; Applicant and Patent Attorney Institute of Agricultural microbiology and Agroindustrial Manufacture of NAAS of Ukraine. no. a 2012 03817; stated on 29.03.2012; posted by 10.01.2014. 3 p. [In Ukrainian].

Received 27.08.2020