

ОСОБЛИВОСТІ ВЗАЄМОДІЇ *AZOSPIRILLUM* SP. З РОСЛИНАМИ СТОКОЛОСУ ЗА УМОВИ ШТУЧНОЇ БАКТЕРИЗАЦІЇ

Волкогон В.В.

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН, Чернігів
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, Україна, 14027

*Інокуляція стоколосу азоспірилами підвищувала активність асоціативної азотфіксації та ініціації розвитку рослин. При цьому в кореневій зоні прижились лише представники *Azospirillum brasilense*. *A. lipoferum* впливали на збільшення цих показників опосередковано – через фізіологічно активні сполуки (ФАС) інокулюму. ФАС впливають на розвиток рослин у перші фази онтогенезу та індукують розвиток у кореневій зоні інших (типових для стоколосу) азотфіксувальних бактерій.*

Ключові слова: інокуляція, азоспірила, стоколос, фізіологічно активні сполуки, асоціативна азотфіксація.

Згідно із сучасними уявленнями, азотфіксуючі бактерії роду *Azospirillum* зустрічаються в ґрунтах усіх кліматичних зон (принаймні в зоні коріння певних видів рослин) [1], включаючи арктичні райони [2]. Виходячи з результатів екологічних досліджень, серед семи відомих на сьогодні видів азоспірил найбільше значення мають *A. lipoferum* та *A. brasilense* [3]. За нашими спостереженнями, представники цих видів утворюють активні азотфіксувальні асоціації з окремими видами злакових трав: *A. lipoferum* – з пажитницею пасовищною, а *A. brasilense* – із стоколосом безостим [4]. Не зважаючи на родову спорідненість названих бактеріальних видів, *A. lipoferum* слабо розвивається в зоні коренів стоколосу в умовах природного розвитку цього ботанічного виду. У зв'язку з цим виникає потреба дослідити можливість розвитку *A. lipoferum* в асоціації із стоколосом за умови штучної інтродукції бактерій в кореневу зону цієї рослини. Крім з'ясування окремих елементів специфічності азоспірил до вищої рослини, вивчення цього питання має і суто практичний аспект: встановити можливість інокуляції травосуміші пажитниця-стоколос одним бактеріальним препаратом.

Результати дослідження цього питання викладенні в даному повідомленні.

Матеріали і методи. Дослідження проводили в умовах вегетаційних дослідів за використання дерново-підзолистого пилюватосупісчаного ґрунту ($pH_{\text{сол.}}$ 5,65 вміст гумусу – 0,8-1,0%). В посудини з ґрунтом (2 кг)

вносили суміш Прянишникова з 0,5 дози азоту. Повторність дослідів п'ятикратна. Вивчали реакцію на бактеризацію азоспірилами стоколосу безостого, *Zerna inermis* (Leyss.), сорту Казаровицький. Для передпосівної бактеризації насіння використовували штами азоспірил: *Azospirillum lipoferum* ЛС-1, *A. lipoferum* ЛС-3, *A. brasilense* 410, ізольовані з коріння пажитниці; *A. brasilense* КО-35, виділений з насіння стоколосу і типовий штам *A. brasilense* Sp7 (ATCC 12157). Попередньо штами адаптували до стрептоміцину (доза 2000 мкг/мл середовища). Антибіотикостійкі форми одержували за методом Зібальського [5], використовуючи градієнт концентрації антибіотика в агарі. Одержані мутанти, які зберігали стійкість до стрептоміцину при пересівах, вирощували в рідкому середовищі з малатом [6] на качалці при 180 об/хв., після чого проводили бактеризацію насіння з розрахунку 200 тис. клітин на одну насінину.

Через 40 днів вирощування рослин в умовах люміностау (інтенсивність освітлення на рівні посудин – 20 тис. люкс, $t^{\circ} = 26^{\circ} + 2^{\circ} \text{C}$) визначали чисельність стрептоміцинстійких клітин в корневих сферах. У зв'язку з тим, що використаний нами метод одержання стрептоміцинстійких форм бактерій дозволяє плавно маніпулювати концентраціями антибіотика, одержані мутанти не відрізнялись від вихідних форм за активністю азотфіксації в чистій культурі. Це дозволило використати для підрахунку чисельності їх клітин селективне напіврідке безазотне середовище Доберейнер із стрептоміцином та ацетиленовий тест при застосуванні методу серійних розведень і таблиць Мак-Креді [7].

Крім ступеня колонізації корневих сфер інтродукованими азоспірилами визначали загальну чисельність азотфіксуючих бактерій методом серійних розведень на напіврідкому малатному середовищі і напіврідкому середовищі Ешбі (але без стрептоміцину) з використанням ацетиленового тесту і таблиць Мак-Креді.

Підрахунок як загальної чисельності клітин діазотрофів, так і інтродукованих азоспірил проводили в ризосферному ґрунті, відмитому корінні та поверхнево простерилізованих коренях. Ризосферним вважали ґрунт, що залишився на корінні у вигляді муфточки після інтенсивного струшування. Коріння відмивали спочатку у водопровідній воді, а потім послідовно, двічі, у стерильній воді при співвідношенні до води приблизно 1:20. Поверхневу стерилізацію коріння проводили 80%-м етанолом протягом 5 хвилин з наступним дворазовим відмиванням у стерильній воді. Чисельність бактерій виражали в значеннях, приведених до абсолютно сухих коріння та ґрунту.

Для вивчення впливу фізіологічно активних речовин культуральної

рідини азоспірил на процес асоціативної азотфіксації, бактеріальну культуру центрифугували при 8000 об./хв., надсадкову рідину фільтрували через мембранний фільтр фірми Sigma з діаметром пор 0,2 мкм. Одержаний фільтрат застосовували для передпосівної обробки насіння стоколосу у кількості, еквівалентній об'єму бактеріальної суспензії в дослідах з інокуляцією.

В посудинах з рослинами визначали нітрогеназну активність ацетиленовим методом в нашій модифікації [8].

Оцінювали також вплив бактеризації на розвиток рослин, зокрема, враховували масу сухої надземної частини рослини та сухого коріння.

Провели досліди та статистичну обробку одержаних результатів за Доспеховим [9].

Результати та їх обговорення. Передпосівна бактеризація стоколосу азоспірилами призводила до збільшення біологічного урожаю рослин при застосуванні практично всіх використаних штамів, незалежно від їх видової належності. Суттєво зростала також активність азотфіксації в кореневій зоні рослин (табл. 1). Слід відмітити тенденцію до збільшення активності азотфіксації у варіантах з інокуляцією *A. brasilense* в порівнянні з використанням *A. lipoferum*, що є цілком природним, зважаючи на високий ступінь специфічності цього бактеріального виду до стоколосу [4].

Таблиця 1. Вплив інокуляції стоколосу азоспірилами на урожайність та активність асоціативної азотфіксації

Варіанти досліду	Суха надземна маса, г/посудину	Маса сухого коріння, г/посудину	Активність азотфіксації, мкг N/посуд. за годину
Контроль, без інокуляції	1,26	0,89	0,160
<i>A. lipoferum</i> , шт. ЛС-1	1,83	1,31	0,310
<i>A. lipoferum</i> , шт. ЛС-3	1,90	1,36	0,305
<i>A. brasilense</i> , шт. 410	2,00	1,45	0,414
<i>A. brasilense</i> , шт. КО-35	2,08	1,49	0,345
<i>A. brasilense</i> , шт. Sp7	1,89	1,33	0,310
НІР ₀₅	0,29	0,35	0,130

Вивчення ступеня колонізації кореневої системи свідчить, що представники *A. brasilense* інтенсивно розвиваються в ризоплані і безпосередньо в корневих тканинах стоколосу, що вказує на ендоефітний

тип штучно створених рослинно-бактеріальних асоціацій. На відміну від цього, представники *A. lipoferum* виявляються в основному в ризосферному ґрунті та ризоплані, причому в невеликих кількостях. Поверхнева стерилізація коріння позбавляє рослини від цих бактерій, що є свідченням відсутності внутрішньої колонізації тканин.

Слід відмітити, що на тип рослинно-бактеріальної асоціації впливає не тільки видова належність бактерії-інокулянта, але й штамова. Так, хоча представники *A. brasilense* в цілому вигідно відрізняються від *A. lipoferum* за ступенем колонізації корневих сфер, серед них штам Sp7 в значно менше, ніж інші штамми, розвивається в зоні коріння стоколосу.

Таблиця 2. Особливості колонізації корневих сфер стоколосу азоспірилами залежно від видових та штамових особливостей бактерій

Варіанти дослідів	Чисельність клітин азоспірил, тис./г		
	ризосферний ґрунт	відміте коріння	поверхнево стерилізоване коріння
Контроль, без інокуляції	0	0	0
<i>A. lipoferum</i> , шт. ЛС-1	28,5	11,5	0,1
<i>A. lipoferum</i> , шт. ЛС-3	10,2	5,0	0,1
<i>A. brasilense</i> , шт. 410	110,5	2850,0	450,0
<i>A. brasilense</i> , шт. КО-35	340,0	2010,0	970,0
<i>A. brasilense</i> , шт. Sp7	98,5	700,0	12,5

Відмічені особливості взаємодії різних видів та штамів азоспірил з рослинами стоколосу повинні були б спричинити і відповідні залежності в показниках рівня азотфіксації. Проте в наших дослідях процес азотфіксації був інтенсивним (і достовірно вищим у порівнянні з контролем) і в тих варіантах, у яких рівень колонізації азоспірилами корневих сфер був невисоким (табл.1 і 2). Ця невідповідність пояснюється результатами обліку загальної чисельності діазотрофів у зоні коренів рослин: нетипові для стоколосу бактерії-інокулянти в наших дослідях сприяють інтенсивному розвитку інших асоціативних азотфіксаторів, які є в складі ґрунтової та насінневої мікрофлори (табл. 3).

Таблиця 3. Чисельність азотфіксуючих бактерій в кореневій зоні стоколосу під впливом інокуляції (тис/г).

Варіанти досліджу	Середовище Доберейнер			Середовище Ешбі		
	ризосферний ґрунт	відміте коріння	поверхнево стерилізоване коріння	ризосферний ґрунт	відміте коріння	поверхнево стерилізоване коріння
Контроль, без інокуляції	83,0	260,0	10,5	120,5	345,0	18,8
A. lipoferum, шт. ЛС-1	214,5	1850,0	320,7	460,7	2200,0	1015,0
A. lipoferum, шт. ЛС-3	255,0	1675,0	377,09	505,2	2070,0	912,5
A. brasilense, шт. 410	311,4	3050,0	70,0	320,5	1340,0	510,0
A. brasilense, КО-35	326,0	2970,0	1150,0	415,0	1225,0	244,5
A. brasilense, Sp 7	227,5	2500,0	560,0	350,0	1190,0	418,9

Іншими словами, стимулююча дія неспецифічних для рослини бактерій, використаних в досліджах, обумовлена не їх розвитком у кореневій зоні і, відповідно, проявом нітрогеназної активності, а ініціюванням ними розвитку та активності інших, типових для даного ботанічного виду мікроорганізмів. Загальна чисельність азотфіксаторів досягає високого рівня в усіх досліджуваних сферах і забезпечує достовірне збільшення активності асоціативної азотфіксації та зростання урожайності. Механізм вище відміченого ефекту, на наш погляд, полягає у фітогормональному впливі інокулянту. Як відомо, регулятори росту рослин здатні активізувати процес асоціативної азотфіксації, рівномірно впливаючи на розвиток всіх типових для рослин діазототрофів і забезпечуючи змішану аутобактеризацію [10]. Оскільки азоспірили здатні до продукування комплексу фізіологічно активних речовин і, в тому числі, гормональної природи [11], цілком імовірно є участь цих сполук в ініціюванні розвитку активних азотфіксуючих асоціацій і, таким чином, процесу азотфіксації. В літературі [12] описано подібний ефект при постановці дослідів з вивчення впливу безклітинного фільтрату рідкої культури бульбочкових бактерій конюшини та люцерни на нодуляційну

активність цих культур.

Для перевірки цього припущення ми провели дослідження впливу культуральної рідини штаму *A. lipoferum* ЛС-3 на активність азотфіксації в кореневій зоні стоколосу. Одержані результати свідчать про значний вплив на цей процес саме культуральної рідини як джерела фізіологічно активних речовин (табл.4).

Таблиця 4. Вплив культуральної рідини штаму *A. lipoferum* ЛС-3 на активність азотфіксації в кореневій зоні стоколосу

Варіанти досліджу	Активність азотфіксації, мкг N / посудину за годину
Контроль, без інокуляції	0,145
Інокуляція <i>A. brasilense</i> , КО-35 *	0,458
Інокуляція <i>A. lipoferum</i> , шт. ЛС-3 *	0,430
Рідке живильне середовище Окона *	0,155
Культуральна рідина штаму <i>A. lipoferum</i> , шт. ЛС-3	0,418
НІР ₀₅	0,077

* – варіанти введено як позитивні контролю

Отже, азотфіксуюча активність у ризосфері інокульованих рослин може зростати не тільки за рахунок збільшення чисельності клітин інтродукованого штаму, а й через появу можливості розвитку інших азотфіксаторів (можливо більш специфічних до даного виду рослин), які знаходять додаткову нішу завдяки первинній дії на рослину рістактивуючих речовин інокулюму. Позитивний вплив фізіологічно активних речовин бактеріального походження на розвиток мікроорганізмів кореневої зони, має, безумовно, опосередкований характер – через вплив на інтенсивність фотосинтезу, ризогенезу та функціонування ферментних систем рослини. Аналогічна закономірність при вивченні впливу синтетичних регуляторів росту на розвиток корневих діазотрофів показана нами раніше [10].

Даними результатами, очевидно, можна пояснити і одержаний окремими дослідниками позитивний ефект інокуляції бактеріями роду *Rhizobium* злакових культур. Так у дослідях Г. Хофліша [13], С. Кавімендена з співавт. [14], бактеризація ризобіями такої культури, як пшениця також приводила, крім збільшення урожайності, і до достовірного збільшення нітрогеназної активності в кореневій зоні.

Одержані результати свідчать також про те, що при дослідженні

штамів асоціативних діазотрофів не можна обмежуватись даними щодо загального впливу бактерій на рослини. Так, якщо скористатись тільки критеріями збільшення урожайності та нітрогеназної активності, можна визнати представників *A. lipoferum* типовими бактеріями кореневої зони стоколосу. Однак вивчення ступеня колонізації коріння цієї культури відповідними бактеріями свідчать, що збільшення активності азотфіксації та підвищення урожайності здійснюється за рахунок інших механізмів взаємодії і, звичайно, в даному випадку ці бактерії можуть бути охарактеризовані як корисні, але не як асоціативні азотфіксатори стоколоса.

Отже, оцінка перспектив застосування штамів асоціативних діазотрофів відповідних видів рослин повинна бути комплексною, з врахуванням впливу на розвиток рослин, процес асоціативної азотфіксації та здатності розвиватись в корневих сферах.

1. Tylor M.E., Milam J.R., Smith R.L., et. al. Isolation of *Azospirillum* from diverse geographic regions // Can. J. Microbiol. – 1979. – 25, № 6. – P. 639-697.

2. Nosco P., Bliss L.C., Cook F.D. The association of free-living nitrogen-fixing bacteria with the roots of High Arctic graminoids // Arc. Alp. Res., 1994. – Vol. 26. – P. 180-186.

3. Krieg N.R., Dohereiner J. The genus *Azospirillum* // *bergey's manual of systematic bacteriology*. Ed. by N.R. Krieg and J.G. Holt. – Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1986. – Vol. 1. – P. 96-104.

4. Волкогон В.В., Хальчицкий А.Е., Миняйло В.Г. и др. Азотфиксирующие микроорганизмы корневой зоны райграса пастбищного и костреца безостого // Микробиол. ж. – 1991. – Т. 53, № 6. – С. 3-8.

5. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта; пер с англ.– М.: Мир, 1984. – Т. 2. – 486 с.

6. Okon Y., Albrecht S.L., Burris R.H. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants // Appl. Environ. Microbiol. – 1977. – Vol. 3, № 1. – P. 83-85.

7. Villemin G., Balandreau J., Dommergues Y. Utilization du test de reduction de l'acetylene pour la numeration des bacteries libres fixatrices d'azote // Ann. Microbiol. Ed Enzimol. – 1974. – Vol. 24, № 2.– P. 87-94.

8. Волкогон В.В. Способ определения активности азотфиксации в почве // Микробиол. ж. – 1984. – Т. 46, № 2. – С. 89-91.

9. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта.- М. Колос, 1979. – 415 с.

10. Волкогон В.В. Влияние стимуляторов роста растений на активность процесса азотфиксации // Микробиол. ж. – 1997. – Т. 59, № 4. – С. 70-78.

11. Govindan M., Purushotaman D. Production of phytohormones by the nitrogen fixing bacterium *Azospirillum* // Agr. Res. J. Kerala. – 1984. – Vol. 22, № 2. – P. 133-138.

12. Francis A.J., Alexander M. Physiological comparison of effective and ineffective strains of two *Rhizobium* species // Soil Sci. – 1974. – Vol. 118, № 1. – P. 31-37.

13. Hofliich G. Influence of inoculation of rhizobium – bacteria on growth of cereals // Zbl. Microbiol. – 1989. – Vol. 144, № 2. – P. 73-79.

14. Kawimandan S.K., Singh R., Bajaj D. ¹⁵N-dilution in wheat – *Rhizobium* system and practice feasibility of such inoculation under field conditions // 14 th Int. Congr. Soil. Sci. (Kyoto, Aug., 1990): Abstr.- Kyoto, 1990. – 3, com 3. – P. 319-320.

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ AZOSPIRILLUM SP. С РАСТЕНИЯМИ КОСТРЕЦА В УСЛОВИЯХ ИСКУССТВЕННОЙ БАКТЕРИЗАЦИИ

Волкогон В.В.

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г. Чернигов

*Инокуляция костреца безостого азоспириллами приводит к увеличению активности ассоциативной азотфиксации и инициации развития растений. При этом в корневой зоне приживаются только представители *Azospirillum brasilense*. А. *lipoferum* влияют на увеличение показателей косвенно – воздействуя физиологически активными соединениями (ФАС) инокулюма. ФАС влияют на развитие растений в первые фазы онтогенеза и индуцируют развитие в корневой зоне других (типичных для костреца) азотфиксирующих бактерий.*

Ключевые слова: инокуляция, азоспирилла, кострец, физиологически активные соединения, ассоциативная азотфиксация.

PECULIARITIES OF AZOSPIRILLUM SP. INTERACTION WITH ZERNA INERMIS BY THE ARTIFICIAL BACTERIZATION.

Volkogon V.V.

Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Chernihiv

Inoculation of Zerna inermis with azospirillum bacteria results in associated nitrogen fixation activity increase and initiation of plant development. Specimens of Azospirillum brasilense only were settled down in root zone. A. lipoferum influence on parameters increase indirectly – due to physiologically active substances (PAS) of inoculums. PAS affect plant growth on the first stages of ontogenesis as well as induce development in root zone of others (typical to Zerna inermis) nitrogen fixation bacteria.

Key words: inoculation, Azospirillum, Zerna inermis, physiologically active substances, associative nitrogen fixation.