

## **МЕТОДИЧНІ АСПЕКТИ ВИВЧЕННЯ АСОЦІАТИВНОСТІ БАКТЕРІЙ ДО РОСЛИН ПШЕНИЦІ ТА ЯЧМЕНЮ**

**Шерстобоев М.К., Мельничук Т.М., Мельник Л.І.**

Південний філіал Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН  
вул. Карла Маркса, 107, смт. Гвардійське, АР Крим, 97513, Україна

*Розроблено методичні підходи до виділення та вивчення асоціативних мікроорганізмів на основі визначального селективного фактора, яким є прижиттєві кореневі екsudати конкретного виду рослин, що надходять в елективний субстрат. Запропонований підхід дає можливість оцінювати ступінь асоціативності штамів бактерій з конкретним видом рослин та проводити пасажування штамів на корінні з метою відновлення їх активності. Активізація штамів – біоагентів бактеріальних препаратів в умовах модельних дослідів забезпечила підвищення їх ефективності на 8-21% .*  
Ключові слова: асоціативність, бактерії, рослини пшениці та ячменю, кореневі виділення

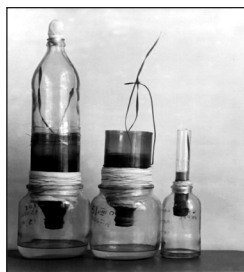
Асоціативні мікроорганізми відіграють важливу роль у житті рослин: використовуючи кореневі екsudати, вони забезпечують рослини елементами живлення, підвищують адаптивний потенціал та ін. [1]. Механізми взаємовпливу організмів у системі “рослина – мікроорганізм” описані в літературі [2, 3, 4]. Використання асоціативних мікроорганізмів у технологіях вирощування сільськогосподарських культур набуває широких масштабів і є пріоритетним та перспективним напрямом сучасного аграрного виробництва [5, 6]. Тому одержання високоактивних і технологічних штамів є одним із першочергових завдань сільськогосподарської мікробіології. Для прискорення вирішення цих питань необхідна розробка та вдосконалення ефективних методів селекції штамів мікроорганізмів, здатних активно колонізувати кореневу систему рослин.

Мета роботи полягала в удосконаленні і розширенні можливостей запропонованого раніше методу [7] та розробці системного підходу до виділення асоціативних мікроорганізмів, при якому головним селективним фактором добору мікроорганізмів є коренева система конкретного виду і сорту рослин, яка функціонує у взаємодії з цими мікроорганізмами. При цьому в елективному середовищі створюються умови, за яких енергетичні потреби мікроорганізмів

задовольняються за рахунок корневих виділень рослини, а вплив лімітуючого розвитку рослин фактора компенсується в результаті функціонування асоціативних мікроорганізмів. Вирішення поставлених задач має забезпечити максимальну цілеспрямованість пошуку, виділення і первинної оцінки штамів та прискорити процес створення нових ефективних біопрепаратів асоціативних мікроорганізмів.

**Матеріали і методи.** У роботі використано принцип елективності, сформульований Виноградським [8].

Дослідження проводили, застосовуючи метод вивчення епіфітних мікроорганізмів, за Худяковим [9], з використанням модифікованих посудин Леонарда [10], придатних для одержання повітряних коренів рослин (рис.1). Модифікаційні зміни вегетаційних посудин Леонарда полягали у вилученні гнота й обв'язуванні горлечка пляшок з темного скла з видаленим дном мірошницьким газом, який запобігає висипанню субстрату, але є проникним для коренів рослин. У місці сполучення з банкою пляшку обв'язували ватно-марлевою пов'язкою, що забезпечувало щільність з'єднання посудин та асептичні умови в банці. За необхідності зменшити газову проникність місце з'єднання посудин додатково ущільнювали 3-5 шарами целофанової стрічки, розмоченої у воді і закріпленої кількома витками ниток. Після заповнення нижньої пляшки кварцовим піском до необхідного рівня наповнювач насичували відповідним, визначеним завданням досліджень, елективним поживним розчином. На нижню пляшку ставили їй подібну, але з безбарвного скла, а місце стикування пляшок обв'язували стрічкою целофану, розмоченою у воді, як описано вище. Горлечко верхньої пляшки закривали ватно-марлевою пробкою і накривали паперовим ковпаком. Підготовлені посудини стерилізували в автоклаві. Після автоклавування целофан щільно притискався до скла, що забезпечувало необхідну міцність і герметичність з'єднання.



*Рис.1. Модифіковані вегетаційні посудини Леонарда для одержання повітряних коренів*

В остиглі посудини через горлечко верхньої пляшки з дотриманням вимог асептики вносили насіння, присипали його 1,5 - сантиметровим шаром стерильного піску і закривали ватно-марлевою пробкою, що забезпечувало стерильність і газообмін.

За необхідності здійснити мікробіологічний контроль лише кореневої системи рослини верхню пляшку не встановлюють, а нижню перед стерилізацією закривають широкою ватно-марлевою пробкою з паперовим ковпачком. Насіння асептично розкладають на остиглому субстраті й у цьому випадку засипають шаром 1,5 см стерильного парафінованого, за Ван-Шревенном [10], піску, що запобігає проникненню до коренів мікроорганізмів з повітря.

Слід зазначити, що повітряні корені, маючи верхівковий ріст, механічно нічого не виносять із субстрату на своїй поверхні. Таким чином забезпечуються умови, при яких поверхню повітряних коренів активно заселяють асоціативні мікроорганізми. Повітряний корінь відрізають стерильним інструментом і використовують для інокуляції насіння у наступних дослідах і для мікробіологічного аналізу.

Невелику кількість насіння, за об'ємом еквівалентну 25 зернам пшениці, стерилізували в компактному і зручному в експлуатації приладі, виготовленому шляхом нескладної переробки скляного лабораторного дозатора на 10 мл (рис. 2). Прилад стерилізували в автоклаві після заповнення водою і накривши паперовим чохлам. Його конструкція дозволяє використовувати для стерилізації насіння як один, так і декілька послідовно застосовуваних стерилізувальних розчинів, з промиванням насіння між кожним з них або без промивання, і з багаторазовим (до 25 разів) остаточним відмиванням стерильною водою.



*Рис.2. Лабораторний дозатор на 10 мл (праворуч) і виготовлений на його основі прилад для стерилізації насіння (ліворуч)*

Для виділення штамів мікроорганізмів вегетаційну посудину заповнюють зволоженим до 60% повної вологоємності ґрунтом досліджуваного зразка, а в банку наливають воду шаром 1-3 см для насичення повітря водяним паром. Проростаючи крізь товщу ґрунту, корені контактують з мікроорганізмами, які містяться в ньому. При цьому повітряні корені, що формуються, заселяються тими з них, котрі самостійно чи у взаємодії з іншими мікроорганізмами здатні асоціюватися з кореневою системою даного виду рослин. Оскільки мікроорганізми і рослина знаходяться у взаємодії, створюються умови накопичувальної культури мікроорганізмів при селективному впливі корневих ексудатів та лімітуючого фактора.

Слід зазначити, що вже на цьому етапі корені заселяються невеликою кількістю видів мікроорганізмів, яких стає ще менше при наступному пасажуванні на рослинах, що вирощуються на елективному субстраті. Це спрощує процес пошуку і виділення активних асоціативних штамів мікроорганізмів. Після виділення і селекції штамів аналогічним чином в елективних умовах оцінюється їх індивідуальна здатність асоціюватися з кореневою системою рослини.

Встановлено, що при використанні 15 - сантиметрового шару вермикуліту як сорбуючого наповнювача навіть при посіві нестерильним насінням поверхня повітряних коренів, які формуються, стерильна. Це може послужити методичною основою виявлення здатності мікроорганізмів даного штаму до ендofітного існування в кореневій системі рослини шляхом простого порівняння посівів на штучних живильних середовищах не роздавленого і роздавленого стерильним пінцетом відрізка повітряного кореня.

**Результати та їх обговорення.** На основі того, що енергетика асоціативної азотфіксації базується на споживанні мікроорганізмами прижиттєвих корневих виділень рослин, було розроблено системний підхід до виділення та первинної оцінки асоціативних мікроорганізмів [11]. Результати досліджень показали, що штам асоціативних мікроорганізмів суттєво відрізняються один від одного за швидкістю заселення повітряного кореня, який виходить з шару піску 8 см, насиченого сольовим розчином безазотного середовища Виноградського. Заселеність повітряних коренів мікроорганізмами вивчали на рослинах пшениці та ячменю. В результаті аналізу основних штамів робочої колекції асоціативних мікроорганізмів вдалося диференціювати їх за швидкістю заселення повітря-

ного кореня рослин, умовно розділивши на три групи (табл.1).

**Таблиця 1. Швидкість заселення штамами мікроорганізмів повітряних коренів пшениці та ячменю в стерильному досліді при шарі піску 8 см**

Штами мікроорганізмів	Вид рослин	Термін появи сходів, дні	Термін виходу кореня, дні	Термін виявлення штамів бактерій після появи повітряного кореня		
				1 доба	3 доба	7 доба
1	2	3	4	5	6	7
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 204	пшениця	4	6	+		
<i>A. radiobacter</i> 8306	– ” –	5	7	+		
<i>A. radiobacter</i> 10	– ” –	7	8	+		
<i>Azotobacter vinelandii</i> 10702	– ” –	2	3	+		
<i>Bacillus sp.</i> 12501	– ” –	3	6		+	
<i>Enterobacter nimipressuralis</i> 32-3	– ” –	4	6		+	
<i>Alkaligenes paradoxus</i> 207	– ” –	4	6		+	
Шт. 15001	– ” –	6	7		+	
Шт. 8304	– ” –	5	6		+	
<i>Enterobacter aerogenes</i> 30 Ф	– ” –	5	6		+	
<i>Azotobacter chroococcum</i> 15003	– ” –	6	6		+	
<i>Paenibacillus polymyxa</i> 6 М	– ” –	2	2		+	
<i>Paenibacillus polymyxa</i> П	– ” –	4	5		+	
<i>Flavobacterium sp.</i> L-30	– ” –	4	5	–	–	–
Шт. Кл.9	– ” –	4	6	–	–	–
Шт. Кл. 9	ячмінь	4	7	+		
<i>Paenibacillus polymyxa</i> П	ячмінь	4	6	+		

*Примітка:* + наявність мікроорганізмів на корені; – відсутність мікроорганізмів на корені

До першої групи високоасоціативних до пшениці віднесені бактеріальні штами *Agrobacterium radiobacter* 204, 8306, 10 та *Azotobacter vinelandii* 10702, які виявлялись в першу добу формування повітряного кореня, тобто розповсюджувались по кореню в процесі його формування. Другу групу складають середньоасоціативні штами, наявність яких зареєстрована на 3 добу після формування повітряного кореня. Представниками цієї групи є бактеріальні штами *Bacillus sp.* 12501, *Enterobacter nimipressuralis* 32-3, *Enterobacter aerogenes* 30 Ф, *Azotobacter chroococcum* 15003, *Paenibacillus polymyxa* 6 М, П. Третю групу складають неасоціативні штами мікроорганізмів. Прикладом цієї групи є бактеріальний штам *Flavobacterium sp.* L-30, неасоціативний до пшениці, і штам Кл.9. Проте до ячменю високоасоціативним виявився саме шт. Кл.9, а також *Paenibacillus polymyxa* П, який є середньоасоціативним до пшениці.

Описаний методичний підхід дає можливість не тільки досить швидко оцінювати ступінь асоціативності штамів мікроорганізмів до конкретного виду рослин, а й проводити пасажування на коренях рослин штамів, які довгостроково зберігаються на штучних поживних середовищах, з метою поновлення їх активності. Таким чином ми поновили активність ряду колекційних штамів і провели їх порівняльну оцінку у вегетаційному досліді з озимою пшеницею на вермикуліті (табл. 2 ).

Наведені дані свідчать про те, що запропонований прийом сприяє відновленню ефективності колекційних штамів. Недавно виділені штами мікроорганізмів після пасажування на рослинах забезпечують менший приріст надземної маси рослин у вегетаційному досліді відносно вихідних, ніж активізовані штами, які довго зберігались на штучних агаризованих поживних середовищах. Так, активізований штам 15001 забезпечив приріст надземної маси озимої пшениці у вегетаційному досліді на 8% більший ніж вихідний, тоді як штам *Bacillus sp.* 12501 – на 13%, а *Agrobacterium radiobacter* 204 – на 21%.

**Таблиця 2. Вплив вихідних та активізованих варіантів колекційних штамів бактерій на надземну масу рослин озимої пшениці за 2 місяці вегетації ( дослід на вермикуліті )**

Штами мікроорганізмів	Маса надземної частини рослин, г	Приріст до контролю	
		г	%
1	2	3	4
Контроль	0,38	–	–
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 204	0,38	0	0
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 204 *	0,46	0,08	21
<i>Alkaligenes paradoxus</i> 207	0,33	- 0,05	-12
<i>Alkaligenes paradoxus</i> 207 *	0,39	0,01	3
<i>Bacillus sp.</i> 12501	0,41	0,03	8
<i>Bacillus sp.</i> 12501 *	0,46	0,08	21
<i>Enterobacter nimipressuralis</i> 32-3	0,37	- 0,01	0
<i>Enterobacter nimipressuralis</i> 32-3 *	0,47	0,09	24
15001	0,46	0,08	21
15001 *	0,49	0,11	29
8304	0,50	0,12	31
8304 *	0,55	0,17	45
НІР <sub>05</sub>		0,05	

*Примітка:* \* – активізований штам

Таким чином, розроблено методичні підходи щодо виділення та вивчення асоціативних мікроорганізмів на основі визначального селективного фактора, яким є кореневі екsudати конкретного виду рослин. Такий системний підхід дає можливість досить швидко оцінювати у змодельованому елективному субстраті ступінь асоціативності штамів мікроорганізмів до конкретного виду рослин та проводити пасажування штамів на коренях рослин з метою відновлення їх активності. Активізація штамів – біоагентів бактеріальних препаратів дала можливість в умовах модельних дослідів підвищити їх ефективність на 8-21%.

1. Whipps J.M., Lynch J.M. The influence of the rhizosphere on crop productivity // *Adv. Microb. Ecol.* – 1986. – Vol.9. – P. 187-244.
2. Lugtenberg B.J.J., de Weger L.A., Bennett J.W. Microbial stimulation of plant growth and protection from disease // *Curr. Opin. Microbiol.* – 1991. – Vol.2. – P.457-464.
3. Кравченко Л.В., Макарова Н.М., Азарова Т.С. и др. Выделение и фенотипическая характеристика ростстимулирующих ризобактерий (PGPR), сочетающих высокую активность колонизации корней и ингибирования фитопатогенных грибов // *Микробиология.* – 2002. – Т.71, №4. – С.521-525.
4. Надкернична О.В. Особливості взаємодії мікро- і макросимбіонтів в системі діазотрофи – небобова рослина: Автореф. дис. д-ра біол. наук: 03.00.16 / Київ, 2004. – 33 с.
5. Патица В.П., Шерстобоева О.В., Патица Т.І. та ін. Мікробіологічні фактори сталого розвитку сучасного землеробства // Зб. “Аграрний вісник Причорномор’я”. Сільськогосподарські науки. – Одеса, 1999. – Вип. 3 (6), Ч.1. – С. 156-160.
6. Волкогон В.В. Мікробіологія у сучасному аграрному виробництві // Сільськогосподарська мікробіологія: Міжвід. тем. наук. зб. – Чернігів: ЦНТЕІ, 2005. – Вип. 1-2. – С. 6-29.
7. Берестецкий О.А., Шерстобоев Н.К., Шерстобоева Е.В., Патыка В.Ф. Модифицированный метод накопительных культур для выделения симбиотрофных азотфиксирующих микроорганизмов // *Микробиол. журн.* – 1986. – Т. 48, № 2. – С. 85-88.
8. Виноградский С.Н. *Микробиология почвы.* – М.: Изд. АН СССР, 1952. – 792 с.
9. Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов. – М.: Изд. МГУ, 1966. – 216 с.
10. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии / Под ред. Н.А. Красильникова. – М.: “Колос”, 1983. – 296 с.
11. Шерстобоев М.К., Мельничук Т.М. Методологічний підхід до вивчення асоціативних мікроорганізмів // Матер. X з’їзду Товариства мікробіологів України (Одеса, 2004): Тез. доп. – Одеса, 2004. – С. 252.



## **МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ АССОЦИАТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ С РАСТЕНИЯМИ ПШЕНИЦЫ И ЯЧМЕНЯ**

**Шерстобоев Н.К., Мельничук Т.Н., Мельник Л.И.**

Южный филиал Института сельскохозяйственной микробиологии УААН, пгт. Гвардейское

*Разработаны методические подходы к выделению и изучению ассоциативных микроорганизмов на основе определяющего селективного фактора, каким являются прижизненные корневые экссудаты конкретного вида растений, поступающие в элективный субстрат. Предложенный системный подход дает возможность оценивать степень ассоциативности штаммов микроорганизмов к конкретному виду растений и проводить пассирование штаммов на корнях с целью возобновления их активности. Активизация штаммов – биоагентов бактериальных препаратов в условиях модельных опытов обеспечила повышение их эффективности на 8-21%.*

*Ключевые слова: ассоциативность, бактерии, растения пшеницы и ячменя, корневые выделения*

## **METHODICAL ASPECTS FOR STUDYING OF BACTERIUM ASSOCIATIVITY WITH WHEAT AND BARLEY PLANTS**

**Sherstoboev N.K., Melnichuk T.N., Melnik L.I.**

The Southern Branch of Institute of Agriculture Microbiology, UAAS, Gvardeyskoye

*It is worked out the methodical approaches to associative microorganisms isolating and studying on the base of determinate selective factor, which is occurring during one`s lifetime root exudates of concrete species of plant and is entering into elected substrate. The recommended system approach gives opportunity to appreciate of degree of associativity between bacterium strains and specific species of plants and to carry out the passage of strains on root of plants for renewal its activity. The carrying out activation of strains-bioagent of bacterial preparates under greenhouse model experiments increased the efficiency this strains by 8-12 %.*

*Key words: associativity, bacterium, wheat and barley plants, roots exudation*