

СЕЛЕКЦІЯ АСОЦІАТИВНИХ З ОВОЧЕВИМИ РОСЛИНАМИ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мельничук Т.М.

Південна дослідна станція Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН,
вул. К. Маркса, 107, смт. Гвардійське, Сімферопольський р-н, АР
Крим, 97513, Україна
E-mail: melnichuk7@mail.ru

*Проведено виділення мікроорганізмів, асоціативних до певного ботанічного виду (*Brassica capitata* var. *alba* Lizg., *Licopersicum esculentum* Mill., *Cucumis sativus* L.), дослідження їх морфологічних, фізіолого-біохімічних властивостей та реакції рослин на інокуляцію. Показано, що кількість виділених ізолятів асоціативних мікроорганізмів залежить від виду макроорганізма та мікроорганізмів ґрунту, в якому формується рослина, і не залежить від чисельності останніх. Одержані ізоляти не проявили абсолютної специфічності до конкретного виду рослин. Окремі штами сприяли збільшенню надземної і кореневої маси рослин *Lepidium sativum* L.*

Ключові слова: *асоціативні мікроорганізми, овочеві рослини, інокуляція, насіння.*

Впровадження екологічно доцільних технологій з використанням мікробних препаратів, орієнтоване на раціональну мобілізацію природних можливостей агроценозів, є одним із шляхів одержання високоякісної конкурентоспроможної сільськогосподарської продукції, збереження родючості ґрунтів та навколишнього середовища. Оптимізація формування мікробних угруповань за інтродукції штамів агрономічно цінних мікроорганізмів у ризосферу овочевих рослин є актуальною для технологій одержання високоякісної овочевої продукції, яка споживається переважно у свіжому вигляді. Сучасні дослідження спрямовані на вивчення особливостей формування асоціативних взаємовідносин у системі «рослина-мікроорганізми», від яких, завдяки здатності мікроорганізмів до азотфіксації, фосфатмобілізації, продукції фітогормонів, покращення водного та мінерального, а також імунного статусу, зниження вмісту етилену в рослинах, тощо, залежить реалізація продуктивного потенціалу макроорганізму [1-5]. Одним

із ключових завдань активізації взаємодії і підвищення ефективності рослин з мікроорганізмами є відбір останніх. Для вирішення цього питання нами раніше [6,7] запропоновано системний підхід до виділення і вивчення асоціативних до конкретного виду рослин мікроорганізмів, де визначальним селективним фактором є нативні кореневі виділення.

Мета роботи полягала у виділенні асоціативних до певного виду рослин мікроорганізмів, вивченні їх морфологічних, фізіолого-біохімічних властивостей та дослідженні реакції рослин на інокуляцію.

Матеріали і методи. Дослідження були направлені на виділення штамів мікроорганізмів, асоціативних до рослин наступних видів: *Brassica capitata* var. *alba* Litzg., *Licopersicum esculentum* Mill., *Cucumis sativus* L. При вирощуванні із поверхнево стерилізованого насіння рослин капусти сорту Дітмаршер фрюєр, помідорів сорту Шанс, огірка сорту Фенікс на трьох субстратах: чорноземі південному з цілини і овочевої сівозміни та тепличній суміші (20 % торф, 10 % перегній) одержували повітряні корені [6], які в стерильних умовах зрізали і розміщували в скляні колби відповідного розміру, заздалегідь зважені на аналітичних терезах. Після зважування добавляли стерильну воду, струшували корені з водою 10 хвилин на коливальці лабораторній для подальшого приготування розведень (як правило 4-е і 5-е). Виділення проводили на агаризованому капустияному середовищі № 19 шляхом поверхневого посіву. Облік видового складу та визначення домінуючих форм на повітряних коренях проводили за методами підрахунку кількості і складу ризосферної мікрофлори [8]. Морфологію колоній описували на 3-тю добу вирощування мікроорганізмів на капустияному середовищі № 19. Морфологію клітин – за використання мікроскопу фірми Carl Zeiss Jena. Вивчення фізіолого-біохімічних властивостей нововиділених ізолятів проводили у порівнянні з колекційними штамми бактерій різних видів за методичними вказівками [9] та визначником Берджи [10]. Спорідненість штамів (коефіцієнт подібності S) визначали, застосовуючи кластерний аналіз (Clusters.xls.) [11]. Оцінку посівних властивостей насіння проводили за Державним стандартом [12] і за вимогами сучасної концепції тестування насіння [13].

Вегетаційні досліди проводили в теплиці у посудинах об'ємом 200 мл на вермикуліті з рослинами крес-салату (*Lepidium sativum*

L.). Інокуляцію здійснювали водною суспензією культур при титрі 3,0-7,5 млрд/мл, з розрахунку 1 % від маси насіння. Вегетаційні досліди та математичну обробку одержаних даних проводили за загальноприйнятими методиками [14].

Результати та їх обговорення. Попередній мікробіологічний аналіз зразків ґрунту (субстратів), з яких проводили виділення асоціативних до певних видів рослин мікроорганізмів, показав, що в тепличній суміші майже вдвічі більше грибів, облікованих на сусло-агарі, та бактерій, які вирости на капустияному середовищі, ніж у чорноземі південному (табл. 1). Кількість бактерій і грибів у зразках чорнозему південного, як цілини, так і овочевої сівозміни, була на одному рівні.

Таблиця 1. Кількість мікроорганізмів у досліджуваних зразках субстратів

Варіанти досліджу	Бактерії на капустияному середовищі, $\times 10^6/\text{г}$ сух. ґрунту	Гриби на сусло-агарі, $\times 10^3/\text{г}$ сух. ґрунту
Овочева сівозміна (чорнозем південний)	1,12 \pm 0,25	25,2 \pm 4,4
Цілина (чорнозем південний)	1,03 \pm 0,65	21,9 \pm 9,9
Теплична суміш	2,80 \pm 0,56	69,5 \pm 9,1

Виділення з повітряних корінців овочевих рослин мікроорганізмів дозволило встановити відмінності і визначити 110 видів колоній (капусти – 31, помідорів – 52, огірка – 27). З метою виявлення домінуючих форм у варіантах досліджу визначали частку видів мікроорганізмів і їх частоту трапляння в загальній кількості виділених ізолятів у залежності від виду рослини та субстрату (ґрунту), з яким контактували корені.

Мікробіологічний аналіз повітряних коренів капусти сорту Дітмаршер фрюер показав, що види мікроорганізмів були малочисельними і тільки один із видів перевищував 50 % рубіж (рис. 1). Цей вид одержаний при вирощуванні рослин на тепличному субстраті, до того ж у цьому варіанті найвищою була частота трапляння всіх видів: половина з них мала показник більше 80 %, а решта – не менше 50 %. Слід відмітити, що саме за використання цього субстрату вихідна кількість мікроорганізмів була найвищою.

Одинадцять видів мікроорганізмів, що відрізнялися за морфологією колоній, виділено на капустиному агаризованому середовищі при змиві з повітряних коренів капусти, вирощуваної у ґрунті овочевої сівозміни. За використання двох інших субстратів відібрано по десять видів мікроорганізмів.

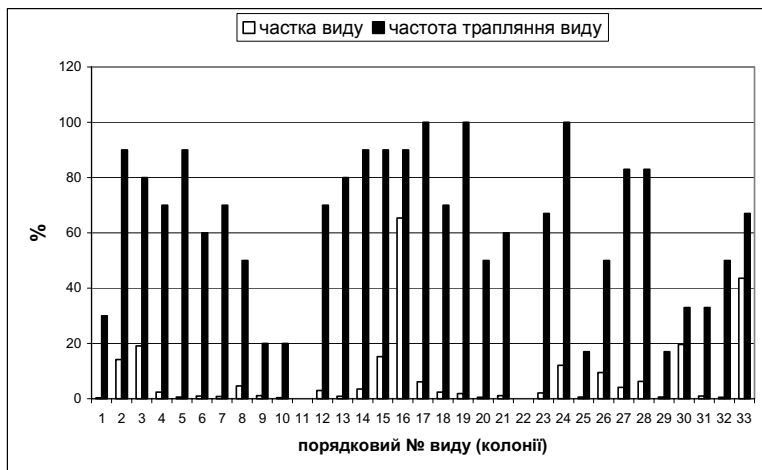


Рис. 1. Частота трапляння видів мікроорганізмів у повітряних коренях рослин капусти сорту Дітмаршер фрюер, вирощених на різних субстратах: цілина (1-10), теплична суміш (12-21), ґрунт овочевої сівозміни (23-33)

Кількість видів мікроорганізмів, одержаних з повітряних коренів помідорів сорту Шанс, була найбільшою серед досліджуваних видів рослин і сягала 20 (рис. 2).

Найменшу кількість видів мікроорганізмів виділено з повітряних коренів огірка сорту Фенікс, вирощених на чорноземі південному овочевої сівозміни, які вирізнялися високими показниками частоти трапляння виду і його частки в загальній чисельності (рис. 3).

Проведена порівняльна оцінка кількості та частоти трапляння видів мікроорганізмів, виділених з повітряних коренів рослин трьох видів (*Brassica capitata* var. *alba* Lizg., *Licopersicum esculentum* Mill., *Cucumis sativus* L.) при їх вирощуванні на трьох вищезазначених субстратах показала, що найбільша частота трапляння видів спостерігається для мікроорганізмів, виділених з повітряних коренів капусти сорту Дітмаршер фрюер, незалежно від субстрату,

та помідорів сорту Шанс при вирощуванні на цілинному ґрунті; найменша – у одержаних з коренів рослин огірка сорту Фенікс.

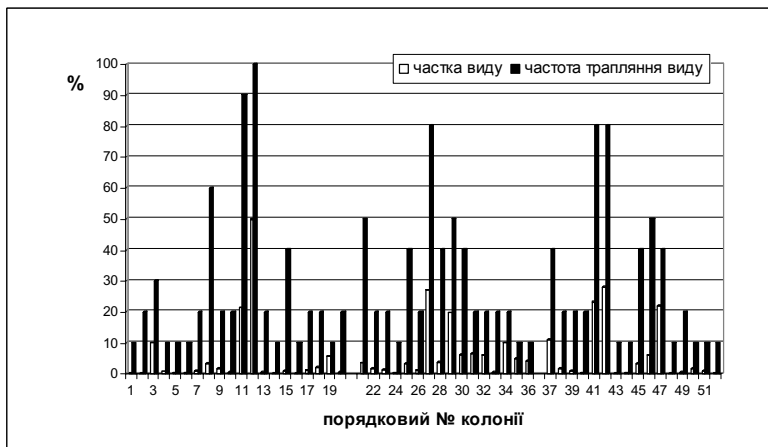


Рис. 2. Частота трапляння видів мікроорганізмів у повітряних коренях рослин помідорів сорту Шанс, вирощених на різних субстратах: цілина (1-20), теплична суміш (21-36), ґрунт овочевої сівозміни (37-52)

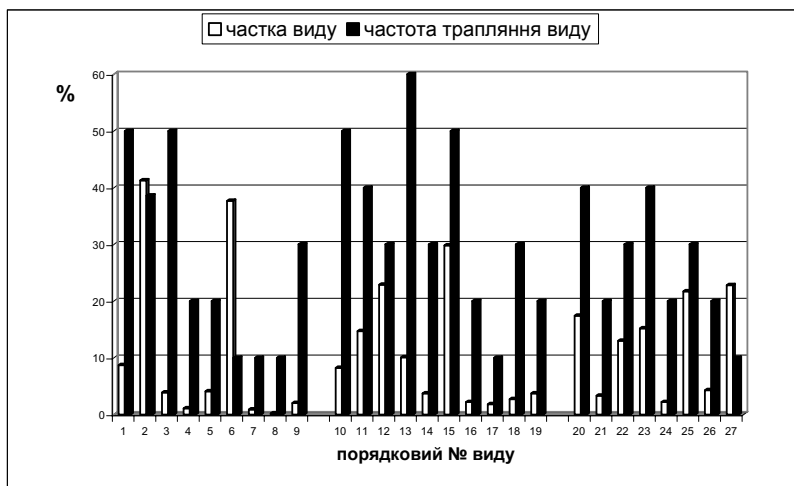


Рис. 3. Частота трапляння видів мікроорганізмів у повітряних коренях рослин огірка сорту Фенікс, вирощених на різних субстратах: цілина (1-9), теплична суміш (10-19), ґрунт овочевої сівозміни (20-27)

Найвищі показники частки видів у загальній їх чисельності мали мікроорганізми, виділені з коренів капусти, а їх кількість була середньою. Теплична суміш забезпечила максимальну чисельність видів мікроорганізмів у рослин капусти і огірка, тоді як за використання цілинного ґрунту – у помідорів.

У дослідження з вивчення властивостей нововиділених мікроорганізмів та їх ідентифікації включали 24 ізоляти, серед яких були представники, виділені з різних видів рослин, вирощуваних на різних субстратах. Проводили дослідження морфологічних, культуральних, біохімічних та фізіологічних властивостей нововиділених ізолятів.

Морфологія колоній була різноманітною, проте можна відмітити переважання округлих і плескатих форм зі зморшкуватою, матовою поверхнею. За морфологією клітин у переважній більшості спостерігали паличкоподібні форми за різних розмірів. Переважали рухливі форми, але з різним ступенем рухливості. Аналіз мікроорганізмів на наявність спор показав, що 57 % від усіх досліджених ізолятів складають спорові бактерії: 60 % – від ізолятів, виділених з повітряних коренів рослин огірка, 62 % – помідорів, 50 % – капусти. На безазотному середовищі Виноградського добре росли 30 % із досліджених ізолятів, стільки ж – не проявили здатності до росту за цих умов, а у 40 % бактерій відмічено слабкий ріст. Строгими аеробами виявилися 12 % ізолятів. Установлено, що нововиділені ізоляти використовують вуглеводи (маніт, глюкозу, сахарозу) та етанол, і тільки 18 % з них – цитрат натрію. Різного ступеню каталазну активність проявляли 88 % досліджених ізолятів, уреазну активність – 52 %, амілазну – 35 %. Здатність до нітратредукції спостерігали у 18 % мікроорганізмів. Показники засвоєння органічних і мінеральних джерел азоту, вуглеводів та етанолу, здатність синтезувати амілазу і відновлювати нітрати, активність каталази, а також їхній окисно-бродильний метаболізм були оцінені за допомогою кластерного аналізу, який дозволив об'єднати їх у групи (рис. 4).

Високий рівень подібності мають ізоляти, виділені з повітряних коренів різних видів рослин, вирощених на різних субстратах, що підтверджує наші попередні результати досліджень щодо їх подібності і віднесення до роду *Bacillus*. Можемо бачити з рис. 4 щонайменше дві групи спорідненості спороутворюючих мікроорганізмів і тільки середній рівень подібності між

представниками грамнегативних бактерій, що потребує додаткових досліджень для остаточної ідентифікації одержаних бактеріальних культур.

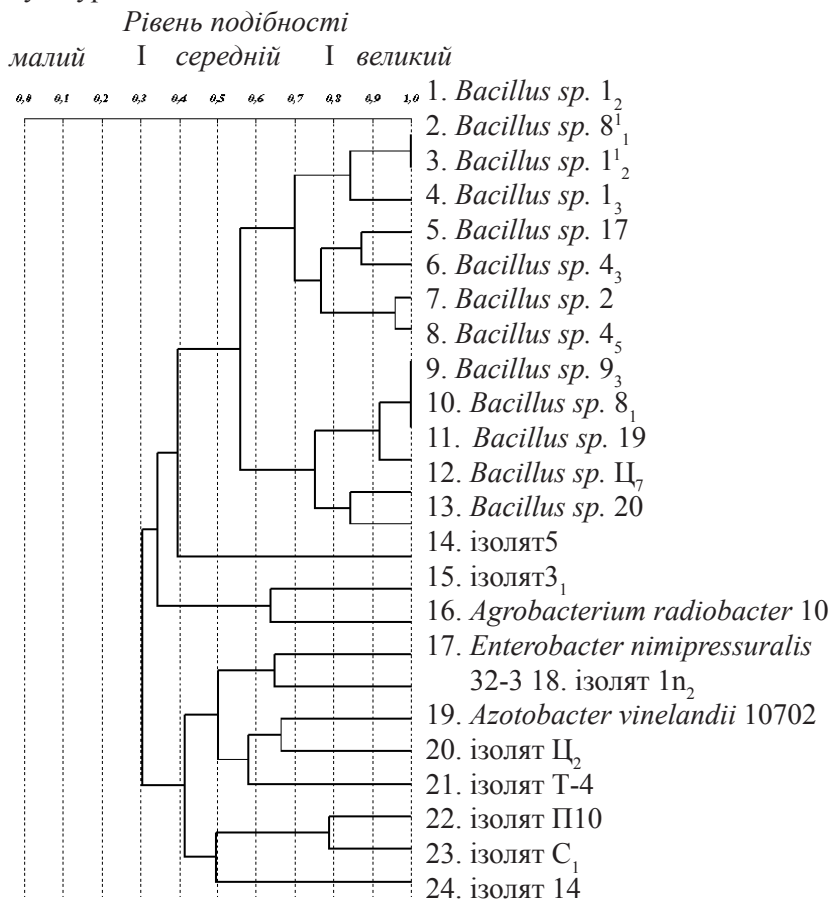


Рис. 4. Дендрограма спорідненості за фенотиповими ознаками ізолятів, виділених із повітряних коренів рослин (кластерний аналіз, Clusters.xls.)

Проводили лабораторні дослідження впливу ізолятів, які увійшли до групи неспорівих мікроорганізмів, на посівні властивості овочевих рослин. Встановлено тенденції позитивного впливу на формування маси проростків помідорів з 2,9 % до 8,0 % при інокуляції вихідною суспензією ізолятів 3₁, 14, Ц₂ (рис. 5). Помітний вплив на показники енергії проростання (3,0 і 6,4 % відносно контролю) та схожості (2,7 і 3,1 % відносно контролю)

насіння огірка виявлено під дією ізолятів 5 і 1n₂, відповідно (рис. 6). Проте маса проростків огірка при інокуляції не змінювалась.

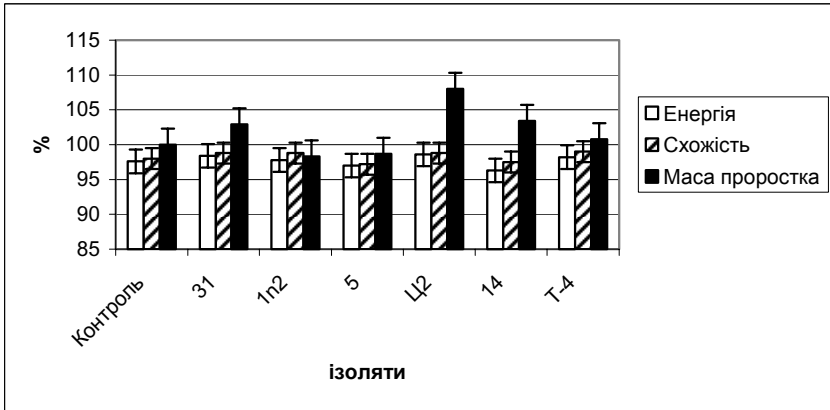


Рис. 5. Вплив інокуляції на посівні властивості насіння помідорів сорту Шанс (енергія проростання і схожість насіння подані у абсолютних %, маса проростка у відносних до контролю)

Проведення оцінки ізолятів за впливом на показники якості насіння огірка і помідорів за допомогою граф-аналізу [11], дало змогу визначити дві групи мікроорганізмів з однаковим коефіцієнтом подібності (S) 0,55. У першу групу ввійшли 3 ізоляти (3₁, Ц₂, Т-4), які демонструють позитивний вплив на насіння помідорів, у другу – 2 (1n₂ і 5), що впливали на посівні властивості огірка. За походженням ці ізоляти були зовсім різні: 3₁, 1n₂ і 5 – виділені з повітряних коренів капусти, Ц₂ – огірка, Т-4 – помідорів.

Рослини крес-салату є чутливими до рістстимулюючих речовин, тому насіння цієї культури інокулювали нововиділеними ізолятами та спостерігали їх розвиток в умовах вегетаційного дослідю. Одержані результати свідчать про те, що всі мікроорганізми позитивно впливали на розвиток рослин крес-салату (табл. 2). Два штами (*Bacillus sp.* 2 та *Bacillus sp.* 4₃) забезпечили достовірне зростання маси сухих коренів, відповідно на 54,5 і 27,3 %, *Bacillus sp.* 2 – також і сухої надземної частини рослини на 27,3 % відносно контролю.

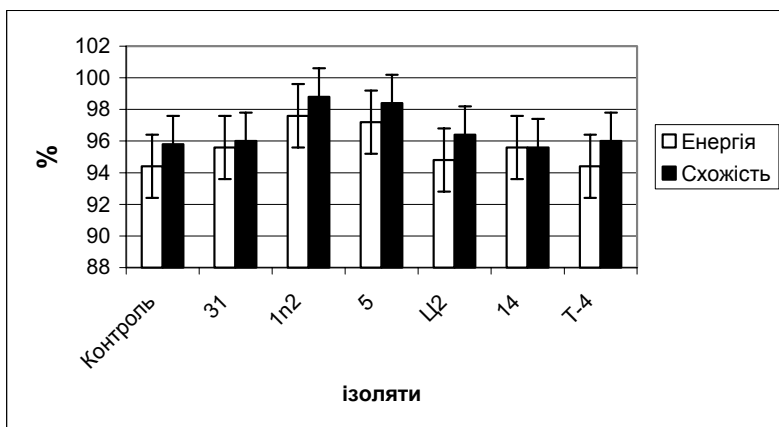


Рис. 6. Вплив нововиділених ізолятів на посівні властивості насіння огірка сорту Лялюк

Таблиця 2. Вплив нововиділених штамів на ріст і розвиток рослин крес-салату (вегетаційний дослід, субстрат – вермикуліт)

Варіанти дослідів	Маса сухої надземної частини		Маса сухих коренів	
	г/рослину	% до контролю	г/рослину	% до контролю
Контроль (без інокуляції)	0,22	100	0,11	100
Інокуляція <i>Bacillus sp.</i> 2	0,28	127,3	0,17	154,5
Інокуляція <i>Bacillus sp.</i> 9 ₃	0,24	109,1	0,13	118,2
Інокуляція <i>Bacillus sp.</i> 4 ₃	0,24	109,1	0,14	127,3
НІР ₀₅	0,05	18,67	0,04	26,42

Таким чином, кількість виділених ізолятів мікроорганізмів, асоціативних до певного виду рослин, залежить від ботанічного виду та складу мікроорганізмів у ґрунті, в якому формується рослина, і не залежить від кількості останніх. Реакція рослин на інокуляцію нововиділеними ізолятами була позитивною. Окремі бактеріальні культури забезпечили зростання сухої надземної і кореневої маси рослин крес-салату відповідно на 27,3 та 27,3-54,5 % відносно контролю.

Проте слід відмітити, що одержані ізоляти не проявили

абсолютної специфічності до виду рослин, з якого їх виділяли і, в тій чи іншій мірі, продемонстрували активність до всіх використаних у дослідах видів рослин. Позитивний вплив виділених бактерій на розвиток досліджених видів рослин обумовлений, перш за все, спроможністю засвоювати кореневі виділення рослин як енергетичну основу своєї життєдіяльності та, завдяки своїй багатofункціональності, створювати сприятливі умови для розвитку макросимбіонту.

1. Кацы Е.И. Молекулярная генетика ассоциативного взаимодействия бактерий и растений: состояние и перспективы исследований /Е.И. Кацы. – М.: Наука, 2007. – 86 с.

2. Роль триптофана в корневых экзометаболитах для фитостимулирующей активности ризобактерий //Л.В. Кравченко, Т.С. Азарова, Н.М. Макарова, И.А. Тихонович //Микробиол. – 2004. – Т. 73, № 2. – С. 195-198.

3. Lucy M. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria /Lucy M., Reed E., Click B. //Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. and Serol. – 2004. – Vol. 86, № 1. – P. 1-25.

4. Penrose D.M. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria /Penrose D.M., Click B.R. //Physiol. Plant. – 2003. – Vol. 118, № 1. – P. 10-15.

5. Effect of transferring 1-aminocyclo-propane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO and its *gacA* derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities /Wang C., Knill E., Click B. R., Defago G. //Canad. J. Microbiol. – 2000. – Vol. 46, № 10. – P. 898-907.

6. Шерстобоев Н.К. Методический подход к изучению ассоциативных микроорганизмов /Шерстобоев Н.К., Мельничук Т.Н. //Вестник Одесского национального университета. – 2005. – Т. 10, Вып. 7. – С. 311-315.

7. Шерстобоев М.К. Методичні аспекти вивчення асоціативності бактерій з рослинами пшениці та ячменю /Шерстобоев М.К., Мельничук Т.М., Мельник Л.І. //С.-г. мікробіологія: міжвід. тем. наук. зб. – Чернівці: ЦНТЕІ, 2005. – Вип. 3. – С. 34-41.

8. Некоторые новые методы количественного учета почвенных микроорганизмов и изучения их свойств /под ред. Ю.М. Возняковской. – Л., 1982. – 52 с.

9. Методические указания по идентификации неспоровых бактерий, доминирующих в ризосфере растений /под ред. Ю.М. Возняковской, Ж.П. Поповой. – Л., 1985. – 44 с.

10. Определитель Берджи: в 2 т. /под ред. Дж. Хоулта, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса; пер. с англ. под ред. Г.А. Заварзина. – 9-е изд. – М.: Мир, 1997. – Т. 1. – 1997. – 430 с.

11. Воробьев Н.И. Методические рекомендации по использованию граф-анализа в исследованиях биосистем /Н.И. Воробьев, О.В. Свиридова, Р.С. Кутузова. – СПб.-Пушкин: ГНУ ВНИИСХМ РАСХН, 2005. – 28 с.

12. Насіння сільськогосподарських культур. Сортові та посівні якості. Технічні умови: ДСТУ 2240-93. – [Чинний від 2008-06-18]. – К.: Держстандарт України, 2008. – 73 с.

13. Алексейчук Г.Н. Физиологическое качество семян сельскохозяйственных культур и методы его оценки /Г.Н. Алексейчук, Н.А. Ламан. – Минск: Право и экономика, 2005. – 48 с.

14. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта /Б.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 352 с.

СЕЛЕКЦИЯ АССОЦИАТИВНЫХ С ОВОЩНЫМИ РАСТЕНИЯМИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Мельничук Т.Н.

Южная опытная станция Института сельскохозяйственной микробиологии УААН, Гвардейское

*Проведено виділення мікроорганізмів, асоціативних к определеному ботаническому виду (*Brassica capitata* var. *alba* Lizg., *Licopersicum esculentum* Mill., *Cucumis sativus* L.), изучение их морфологических, физиолого-биохимических свойств и реакции растений на инокуляцию. Показано, что количество выделенных изолятов асоціативних мікроорганізмів зависит от вида макроорганізма и мікроорганізмів ґрунту, в которой формируется растение, и не зависит от количества последних. Полученные изоляты не проявили абсолютной специфичности к конкретному виду растений. Отдельные штаммы способствовали возрастанию надземной и корневой массы растений *Lepidium sativum* L. соответственно на 27,3 и 54,5 %.*

Ключевые слова: асоціативні мікроорганізми, овочні растения, инокуляція, семена.

SELECTION OF MICROORGANISMS ASSOCIATIVE TO VEGETABLE PLANTS

Melnichuk T.N.

The South Experimental Station of Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Gvardeyskoye

Microorganisms associative to the specific botanical species (Brassica capitata var. alba Litzg., Licopersicum esculentum Mill., Cucumis sativus L.) were isolated followed by the study of their morphological, physiology-biochemical properties and plants' reaction on inoculation. It was shown that the quantity of isolated associative microorganisms' isolations had depended both on the specie of macroorganism and microorganisms of soil in which the plant was formed, and had not depended on the quantity of microorganisms in the soil. These isolations had not showed the absolute specificity to the specific plant species. Some strains had promoted increase of overgrown and root weight of Lepidium sativum L. plants on 27,3 and 54,5 % correspondingly.

Key words: *associativemicroorganisms, vegetable plants, inoculation, seeds.*