

ОЦІНКА БІОЛОГІЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ПЕРСПЕКТИВНИХ ДОМІНАНТНИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РИЗОСФЕРИ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО

М. О. КІРОЯНЦ, аспірант

E-mail: midiya1993@gmail.com

М. В. ПАТИКА, доктор сільськогосподарських наук, професор,

член-кореспондент НААН

E-mail: npatyka@gmail.com

Т. І. ПАТИКА, доктор сільськогосподарських наук, професор

Національний університет біоресурсів і природокористування України

E-mail: patykatatyana@gmail.com

<https://doi.org/10.31548/dopovid2021.01.001>

Анотація. Важливим завданням сучасного сільськогосподарського виробництва є створення нових екологічно безпечних агротехнологій, спрямованих на підвищення продуктивності сільськогосподарських культур. Ячмінь ярий – важлива зернофуражна культура, яка займає істотне місце в балансі концентрованих кормів. Тому наше дослідження досить актуальне у наш час, з огляду на тенденції до переходу на екологічне землеробство і розвиток біологічних добрив. Метою дослідження було визначення ефективності інокуляції домінантними штамами бактерій ризосфери *Phyllobacterium ifriqiense* 1 та *Bacillus methylotrophicus* 10 насіння ячменю ярого та фізіологічні параметри росту і розвитку культури в модельних умовах. Завдання дослідження – визначення титру життєздатних бактерій, експозиція насіння ячменю ярого у бактеріальній суспензії, облік росту рослин ячменю ярого та фіксація його біометричних показників після бактерізації; визначення фізіологічних параметрів росту і розвитку рослин у модельних умовах. Методи дослідження – мікробіологічні (прямий підрахунок життєздатних колонієутворюючих одиниць за допомогою камери Горяєва). Показники фотосинтетичної діяльності листка визначали за допомогою біофізичного методу індукції флуоресценції хлорофілу портативним приладом «Флоратест». Результати досліджень – штам *Phyllobacterium ifriqiense* 1 продемонстрував максимальний біологічний ефект на ростові показники тест-культури ячменю (включаючи розведення культуральної рідини). Встановлено, що обробка бактеріальними суспензіями *Phyllobacterium ifriqiense* 1 та *Bacillus methylotrophicus* 10 сприяє активізації функцій фотосинтетичного апарату рослин ячменю в лабораторних умовах. Перспективи – ризосферні мікроорганізми є важливими компонентами середовища вже на перших етапах онтогенезу зернових культур, тому використання домінантних бактерій-інокулянтів має науково-практичне значення у оптимізації технологій агровиробництва.

Ключові слова: *Phyllobacterium ifriqiense* 1, *Bacillus methylotrophicus* 10, інокуляція, біометричні показники, ячмінь ярий, флоратест

Кіроянц М. О., Патики М. В., Патики Т. І.

Актуальність дослідження.

Мікробні угруповання є найбільш чутливим та динамічним компонентом ґрунту, особливо в умовах антропогенного навантаження. Зважаючи на той факт, що ґрунтові мікроорганізми відіграють виняткову роль у кругообігу речовин, продуктивності фітоценозів і стійкості екосистем загалом, одним із пріоритетних завдань є вивчення функціональних характеристик мікробіомів ґрунту в умовах зернових агроценозів. Екологічні функції ґрунтових мікроорганізмів настільки різноманітні та численні, що входять практично в усі типи біогеноценотичних функцій ґрунтів [1-4].

Від видоспецифічності рослин і ризосферних мікроорганізмів залежить рівень генетичного потенціалу сільськогосподарських культур, що зумовлює формування рослинно-мікробних систем, доступність поживних речовин та імовірність розвитку контролюючих, антагоністичних та інших конкурентоздатних біоагентів [5-7]. Ризосфера рослин є унікальним середовищем, особливість якого полягає в постійному надходженні низькомолекулярних сполук у вигляді корневих ексудатів. У ризосфері підтримується велика кількість метаболічно активної мікробіоти, біомаса і поліморфізм якої може бути вищим на кілька порядків, ніж у

загалом у орному шарі ґрунту. Взаємодії між рослинами і мікроорганізмами в значній мірі не розкриті, а сучасні дослідження свідчать про виняткову складність цих взаємодій і чинників, що впливають на них. Отже, комплексні дослідження біологічної системи «рослина-ґрунт-мікробіота» є надзвичайно перспективними, особливо для пошуку нових універсальних агентів біопрепаратів, розробки біотехнологічних аспектів формування рослинно-мікробних взаємодій в зернових агроценозах.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. В останній час активно вивчається вплив і дія різних біопрепаратів на онові бактерій та їх вплив на активність мікробіоти ґрунту в ризосфері ячменю ярого. Спостерігається значне покращення врожаю та фітопатологічного стану рослин за використання біодобрив у порівнянні з мінеральними добривами.

Мета дослідження — визначення ефективності інокуляції домінантними штамами бактерій ризосфери *P. ifriqiense* 1 та *B. methylotrophicus* 10 насіння ячменю ярого та фізіологічні параметри росту і розвитку культури в модельних умовах.

Матеріали і методи дослідження. У дослідженнях використовували домінантні штамами мікроорганізмів *P. ifriqiense* 1 та *B. methylotrophicus* 10, які виділено та ідентифіковано на базі

Кірюянц М. О., Патика М. В., Патика Т. І.

Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Мікробіологічний аналіз чисельності життєздатних колонієутворюючих одиниць в 1 мл (КУО/мл) суспензії

здійснено за методом прямого підрахунку клітин у камері Горяєва [8], розраховуючи титр за формулою (1):

$$M = \frac{Ax400}{1000}, \text{ млрд./мл} \quad (1)$$

де, M - титр (10^{-9}); A - середнє значення клітин бактерій ($\frac{\Sigma}{16}$).

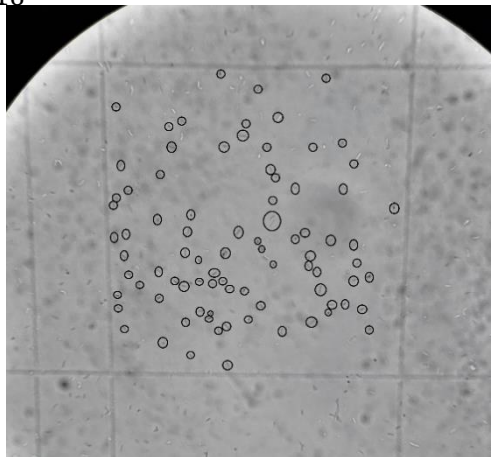


Рис. 1. Прямий підрахунок клітин бактерій, камера Горяєва (x100)

Мікроскопічні дослідження готових препаратів проводили за допомогою світлового мікроскопу Sigeta MB-130, збільшення 40х, іммерсійний об'єктив 90х, мікроскопу «Axiostar plus», ICS, збільшення 100х, у препаратах «жива крапля», а також фіксованих препаратах, забарвлених фуксином. У досліді використано сучасну безокулярну систему візуалізації клітин EVOS FL.

У лабораторному досліді експозиція насіння ячменю ярого в бактеріальних суспензіях штамів *P. ifriqiense 1*, *B. methylotrophicus 10* складала 5-7 хвилин за вихідних показниках титру $6,0 \times 10^7$ КУО/ мл суспензії та у розведенні 1:1. Тривалість модельного досліді 10 діб, за постійного зволоження

фільтрувального паперу у чашках Петрі.

Для аналізу брали біологічну повторність – 10 рослин на варіант, повторність у досліді – триразова.

Дослідження змін функціонального стану і активності фотосинтетичного апарату тест-рослин ячменю виконували, застосовуючи біофізичний метод індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ), фіксуючи дані портативним приладом вітчизняного виробництва «Флоратест» за загальноприйнятою методикою [9]. Фотохімічну активність листків визначали в лабораторії «Біотехнології та клітинної селекції» кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП України. Портативний прилад

Кірюянц М. О., Патики М. В., Патики Т. І.

«Флоратест» (Україна) оснащений рідинно-кристалічним дисплеєм (128x64 пікселів) і виносним оптоелектронним датчиком із довжиною хвилі опромінення 470 ± 15 нм, площею плями опромінення не менш як 15 мм^2 та освітленості в її межах не менш як $2,4 \text{ Вт/м}^2$. Спектральний діапазон вимірювання інтенсивності флуоресценції – від 670 до 800 нм. Дані, виміряні приладом, опрацьовували за допомогою програмного забезпечення «Флоратест», отримані результати відображено у табличній або графічній формі. Темнова адаптація листків перед вимірюваннями становила не менш як 20 хв.

Повторність вимірювань у кожному варіанті триразова. Коефіцієнти K^1 , K^2 та K^3 розраховували, як середнє арифметичне трьох показників приладу «Флоратест».

Статистичний аналіз проведено за програмою Statistica 8.0, дані обчислено за MS Excel.

Результати досліджень та їх обговорення. В умовах модельного вегетаційного дослідження встановлено, що штам *P. ifriqiense* 1 збільшує довжину коренів на 84,3 % відносно контролю та на 42,2 % у варіанті з використанням штаму *B. methylotrophicus* 10. Довжина проростків на відповідно 33,7 % та 16,0 % – без розведення (таблиця 1).

1. Вплив домінантних ризосферних штамів на біометричні показники тест-культури ячменю ярого (модельний вегетаційний дослід, 2020 р.)

Варіант досліджу	Вихідний титр КУО/мл суспензії (без розведення)		Розведення 1:1	
	довжина кореня, см	довжина пагону, см	довжина кореня, см	довжина пагону, см
Контроль	10,2	18,7	—	—
<i>P. ifriqiense</i> 1	18,8	25,0	19,5	27,2
<i>B. methylotrophicus</i> 10	14,5	21,7	16,5	22,7
<i>HIP05</i>	0,3	0,5	0,1	0,6

Аналіз росту рослин ячменю на 10 добу росту представлений в таблиці 2. на ростові показники тест-культури ячменю і за розведення культуральної рідини.

Штам *P. ifriqiense* 1 продемонстрував максимальний ефект

Табл. 2. Результати аналізу росту ячменю ярого за інокуляції насіння домінантними штамми мікроорганізмів

Контроль (без обробок, вода)	Розведення	<i>Phyllobacterium ifriqiense</i> 1, %	<i>Bacillus methylotrophicus</i> 10, %
	1:0	$\geq 90,0$	$\geq 90,0$
	1:1	+33,0	+28,0

Примітка: достовірність аналізування встановлено порівнюючи крайні значення повторів з середньоарифметичним.

Кіроянц М. О., Патики М. В., Патики Т. І.

За морфологічними ознаками корені проростків ячменю, вирощених за замочування у бактеріальних суспензіях дослідних штамів, характеризувалися щільнішим ростом корневих волосків порівняно з контрольними рослинами.

Встановлено, що обробка бактеріальними суспензіями *P.*

ifriqiense 1 та *B. methylotrophicus* 10 сприяє активізації функцій фотосинтетичного апарату рослин ячменю в лабораторних умовах. Так, показник впливу екзогенних факторів (K^1), що відповідає впливу чинників зовнішнього середовища на рослинний організм у тест-рослин становив 71,0 та 77,0 % (рис. 1).

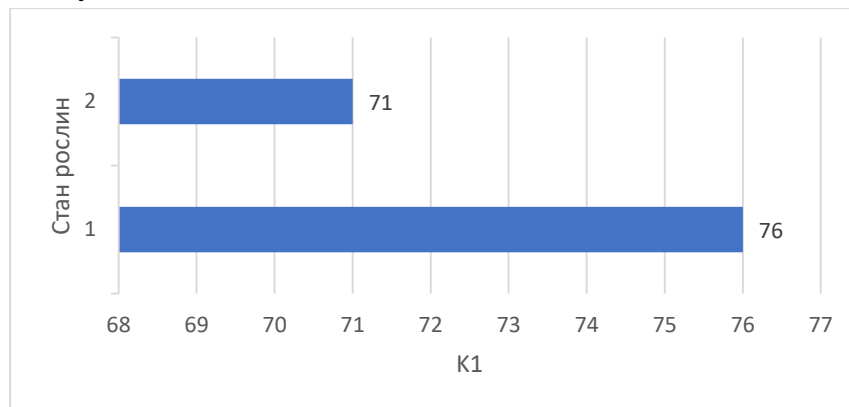


Рис. 2. Параметри вимірювання впливу екзогенних чинників (K^1) на рослини ячменю після інокуляції штамми: 1 — *B. methylotrophicus* 10, 2 — *P. ifriqiense* 1.

Аналіз коефіцієнта індукції флюоресценції (K^2), що корелює із активністю рибулозобісфостфаткарбоксилази /ок

сигенази (основного ферменту циклу Кальвіна) засвідчив, що коефіцієнт K^2 відповідно становить 61,0 % та 72,0 %.

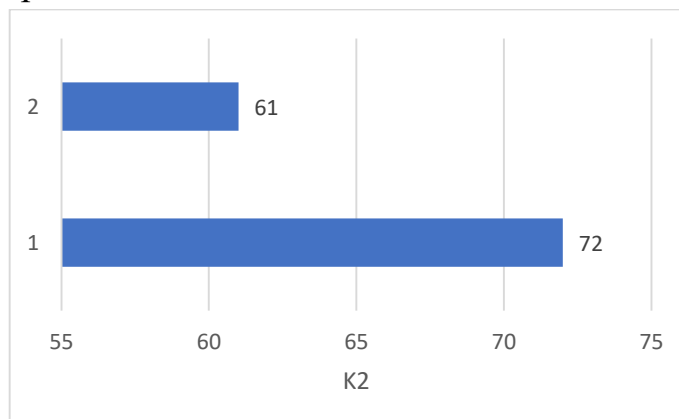


Рис. 3. Параметри вимірювання коефіцієнту індукції флюоресценції (K^2) листків, оброблених штамми: 1 — *B. methylotrophicus* 10, 2 — *P. ifriqiense* 1.

Кіроянц М. О., Патики М. В., Патики Т. І.

Показник впливу ендогенних чинників (K^3), що відповідає внутрішньосистемним чинникам, таким як фітогормональна регуляція

рослин і забезпеченість поживними речовинами, характеризувався такими показниками – 55,0 та 99,0 %, рис. 3.

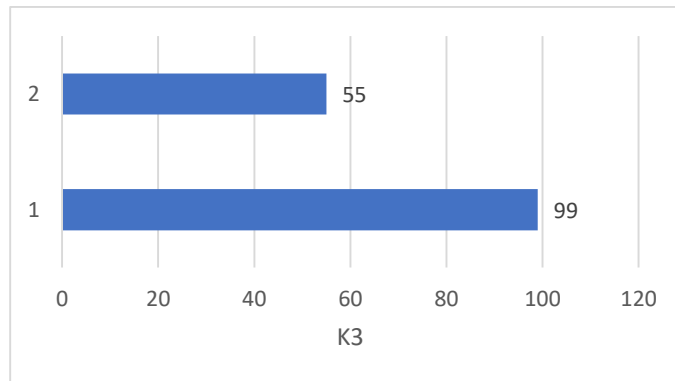


Рис. 3. Параметри вимірювання впливу ендогенних чинників (K_3) листків за інокуляцією штамами: 1 — *B. methylophilus* 10, 2 — *P. ifriqiense* 1.

Залежно від стану фотосинтетичного апарату інтенсивність флуоресценції хлорофілу може змінюватись у широкому діапазоні, що спостерігається за опромінювання попередньо адаптованого до темряви листка рослини, водночас інтенсивність флуоресценції спочатку різко зростає, а потім поступово знижується. Цей ефект був вперше виявлений і досліджений Каутським і тому отримав назву «ефект Каутського», або ефект «індукції флуоресценції хлорофілу». Залежність інтенсивності флуоресценції хлорофілу від часу після початку опромінювання відома, як індукційна крива, або крива індукції флуоресценції хлорофілу. Форма цієї кривої досить чутлива до змін, які відбуваються у фотосинтетичному апараті рослин під

час адаптації його до різних умов довкілля, що стало основою широкого використання ефекту Каутського в дослідженні фотосинтезу рослин і оцінки їх стану під впливом стресових чинників.

На рис. 4 наведена типова крива ІФХ, за інокуляції ячменю ярого суспензією штаму *P. ifriqiense* 1.

Показники кривої індукції флуоресценції хлорофілу було опрацьовано і найбільшій уваги приділено функції $(F_{max}-F_{st})/F_{st}$, яка показує індекс життєздатності Rfd (адаптивності) рослин, де F_{max} – максимальна флуоресценція, F_{st} – стаціонарна флуоресценція. І відповідно індекс життєздатності рослин за обробки бактеріальною суспензією *P. ifriqiense* 1 становив 0,6 %; та за обробки *B. methylophilus* 10 — 0,7 %.

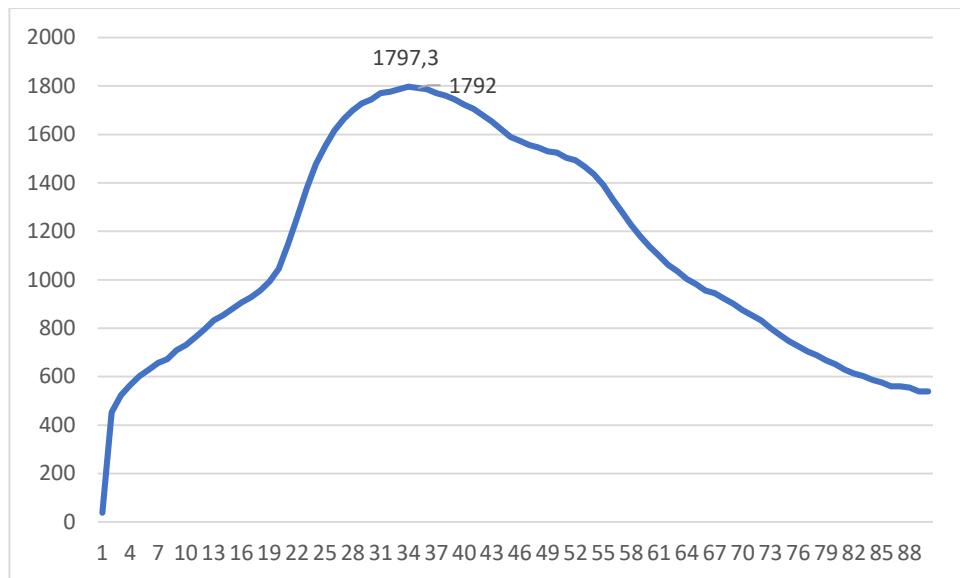


Рис. 4. Крива ІФХ, за обробки ячменю ярого суспензією штаму *P. ifriqiense* 1.

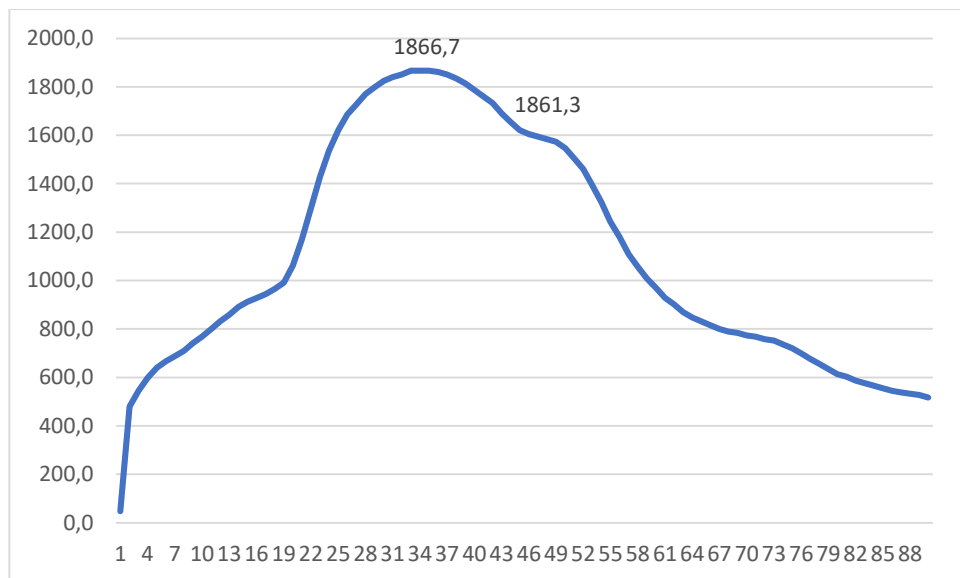


Рис. 5. Крива ІФХ за обробки ячменю суспензією штаму *B. methylotrophicus* 10.

Висновки і перспективи. Штам *P. ifriqiense* 1 продемонстрував максимальний біологічний ефект на ростові показники тест-культури ячменю (включаючи розведення культуральної рідини). Спостерігається збільшення довжини коренів тест-рослин ячменю ярого на 84,3 % щодо контролю. Інокуляція бактеріальними суспензіями *P.*

ifriqiense 1 та *B. methylotrophicus* 10 сприяє активізації функцій фотосинтетичного апарату рослин ячменю в лабораторних умовах. Так, показник впливу екзогенних чинників (K_1) у діапазоні 71,0 та 77,0 %; показник впливу ендогенних чинників (K_3) відповідно — 55,0 та 99,0 %. Отже, ризосферні мікроорганізми є важливими

Кіроянц М. О., Пати́ка М. В., Пати́ка Т. І.

компонентами середовища вже на перших етапах онтогенезу зернових культур, тому використання домінантних бактерій-інокулянтів має науково-практичне значення під час оптимізації технологій агровиробництва. Доведено, що ключовими умовами для здорового росту і розвитку рослин вже на перших етапах вегетації є участь біологічної складової в ризосфері (високоєфективні штами природного типу), а також формування трофічних

зв'язків з рослиною. У цьому аспекті використання домінантних мікроорганізмів *P. ifriqiense* 1 та *B. methylophilicus* 10 сприяє оптимальним умовам вегетації рослин. Мікроорганізми є принципово важливими компонентами середовища (грунту), в якому вони відіграють ключову роль у функціонуванні екосистем за допомогою контролю реакції поживних циклів.

Список використаних джерел

1. Гадзало Я. М., Пати́ка Н. В., Зари́шняк А. С. Агробіологія ризосфери рослин. Монографія. К.: Аграрна наука. 2015. 386 с.

2. Пати́ка М. В., Тонха О. Л., Сінченко В. М., Гончар А. М., Пати́ка Т. І. Особливості формування структурово-функціонального складу мікробіому чорнозему цілинного в степу України. Мікробіологічний журнал. 2019. Т. 81 (№4). С. 90-106.

<https://doi.org/10.15407/microbiolj81.04.090>

3. Гадзало Я. М., Пати́ка М. В., Зари́шняк А. С., Пати́ка Т. І. Агромікробіологія з основами біотехнології. Монографія. К.: Аграрна наука НААН. 2019. с. 204.

4. Пати́ка М. В., Тонха О. Л., Пати́ка Т. І., Кіроянц М. О., Веретюк С. В. Оцінка метагеному прокаріотного комплексу чорнозему за аграрного використання. Мікробіологічний журнал. 2018. Т.80 (№6). С. 109-122.

<https://doi.org/10.15407/microbiolj80.06.109>

5. Пати́ка М. В., Колодяжний О. Ю., Ібату́лін І. І. Оцінка метагеному та детекція функціонально значущих поліморфізмів прокаріот ґрунту з використанням методу піросеквенування. Мікробіологічний журнал. 2016. Т.78 (№2). С.43-51.

6. Lambers H., Mougel C., Jaillard B., Hisinger P. Plant-microbe interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. Plant Soil. 2009. Vol. 321. P. 83–115.

7. Paul E. A. Soil microbiology, ecology and biochemistry. Academic press, 2014. P. 573.

8. Звягинцева Д. Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: МГУ, 1991. 304 с.

9. Портативний флуорометр «Флоротест»: настанова з експлуатації. Київ: Ін-т кібернетики ім. В. М. Глушкова НАН України, 2013. 24 с.

References

1. Gadzalo Y. M., Patyka N. V., Zarishnyak A. S. (2015). Agrobiologiya rizosfery rasteniy. Monografiya. K.: Agrarna nauka. 386.

2. Patyka M.V., Tonkha O.L., Sinchenko V.M., Honchar A.M., Patyka T.I. (2019). Osoblyvosti formuvannia strukturovo-funktsionalnoho skladu mikrobiomu chornozemu tsilynnoho v stepu Ukrainy. Mikrobiolohichniy zhurnal. Vol.81 (№4). P. 90-106.

<https://doi.org/10.15407/microbiolj81.04.090>

3. Hadzalo I.M., Patyka M.V., Zaryshniak A.S., Patyka T.I. (2019). Ahromikrobiolohiia z osnovamy biotekhnolohii. Monohrafiia. K.: Ahrarna nauka NAAN. p. 204.

4. Patyka M.V., Tonkha O.L., Patyka T.I., Kiroiants M.O., Veretiuk S.V. (2018). Otsinka metahenomu prokariotnoho kompleksu chornozemu za ahrarnoho vykorystannia. Mikrobiolohichniy zhurnal. Vol.80 (№6). P. 109-122.

<https://doi.org/10.15407/microbiolj80.06.109>

Кірюянц М. О., Пати́ка М. В., Пати́ка Т. І.

5. Patyka M.V., Kolodiaznyi O.Y., Ibatullin I.I. (2016). Otsinka metahenomu ta detektsiia funktsionalno znachushchykh polimorfizmiv prokariot hruntu z vykorystanniam metodu pirosekvenuvannia. Mikrobiolohichnyi zhurnal. Vol. 78 (№2). P. 43-51.

6. Lambers H., Mougel C., Jaillard B., Hisinger P. (2009). Plant-microbe interactions

in the rhizosphere: an evolutionary perspective. Plant Soil. Vol. 321. – P. 83–115.

7. Paul E. A. (2014). Soil microbiology, ecology and biochemistry. Academic press. 573 p.

8. Zvyagintseva D. G. (1991). Metodyi pochvennoy mikrobiologii i biohimii. MGU. 304 p.

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДОМИНАНТНЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РИЗОСФЕРЫ ЯЧМЕНЯ ЯРОВОГО

М. О. Кірюянц, Н. В. Пати́ка, Т. І. Пати́ка

Аннотация. Важной задачей современного сельскохозяйственного производства является создание новых экологически безопасных агротехнологий, направленных на повышение продуктивности сельскохозяйственных культур. Ячмень - важная зернофуражная культура, занимающая существенное место в балансе концентрированных кормов. Поэтому наше исследование достаточно актуально в наше время, учитывая тенденции к переходу на экологическое земледелие и развитие биологических удобрений. Целью исследования было определение эффективности инокуляции доминантными штаммами бактерий ризосферы *Phyllobacterium ifriqiense* 1 и *Bacillus methylotrophicus* 10 семян ячменя ярового и физиологические параметры роста и развития культуры в модельных условиях. Задача исследования – определение титра жизнеспособных бактерий, экспозиция семян ячменя ярового в бактериальной суспензии, учет роста растений ячменя ярового и фиксация его биометрических показателей после бактеризации; определения физиологических параметров роста и развития растений в модельных условиях. Методы исследования – микробиологические (прямой подсчет жизнеспособных колониеобразующих единиц с помощью камеры Горяева). Показатели фотосинтетической деятельности листа определяли с помощью биофизического метода индукции флуоресценции хлорофилла портативным прибором «Флоратест». Результаты исследований – штамм *Phyllobacterium ifriqiense* 1 продемонстрировал максимальный биологический эффект на ростовые показатели тест-культуры ячменя (включая разведение культуральной жидкости). Установлено, что обработка бактериальными суспензиями *Phyllobacterium ifriqiense* 1 и *Bacillus methylotrophicus* 10 способствует активизации функций фотосинтетического аппарата растений ячменя в лабораторных условиях. Перспективы - ризосферные микроорганизмы являются важными компонентами среды уже на первых этапах онтогенезу зерновых культур, поэтому использование доминантных бактерий-инокулянтов имеет научно-практическое значение при оптимизации технологий агропроизводства.

Ключевые слова: *Phyllobacterium ifriqiyense 1*, *Bacillus methylophilus 10* инокуляція, біометричні показники, ячмень, флоратест

ESTIMATION OF THE BIOLOGICAL EFFICIENCY OF PROSPECTIVE DOMINANT STRAINS OF BACTERIA IN THE RHIZOSPHERE OF SPRING BARLEY

M. O. Kiroiants, M. V. Patyka, T. I. Patyka,

Annotation. An important task of modern agricultural production is the creation of new environmentally friendly agricultural technologies aimed at increasing the productivity of crops. Spring barley is an important forage crop, which occupies a significant place in the balance of concentrated feed. Therefore, our study is quite relevant today, given the trend towards the transition to organic farming and the development of biological fertilizers. The aim of the study was to determine the efficiency of inoculation with dominant strains of rhizosphere bacteria *Phyllobacterium ifriqiyense 1* and *Bacillus methylophilus 10* seeds of spring barley and physiological parameters of growth and development of the culture in model conditions. The task of the study is to determine the titer of viable bacteria, exposure of spring barley seeds in bacterial suspension, accounting for the growth of spring barley plants and fixing its biometric parameters after bacterization; determination of physiological parameters of plant growth and development in model conditions. Research methods – microbiological (direct calculation of viable colony-forming units using Goryaev's camera). Indicators of photosynthetic activity of the leaf were determined using the biophysical method of induction of chlorophyll fluorescence by a portable device "Floratest". The results of studies – the strain *Phyllobacterium ifriqiyense 1* showed the maximum biological effect on the growth of test culture of barley (including dilution of culture fluid). It was found that treatment with bacterial suspensions of *Phyllobacterium ifriqiyense 1* and *Bacillus methylophilus 10* promotes the activation of the functions of the photosynthetic apparatus of barley plants in the laboratory. Prospects – rhizosphere microorganisms are important components of the environment in the early stages of ontogeny of cereals, so the use of dominant inoculating bacteria has scientific and practical significance in the optimization of agricultural production technologies.

Key words: *Phyllobacterium ifriqiyense 1*, *Bacillus methylophilus 10*, inoculation, biometric indicators, spring barley, floratest