

## **АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ АЗОТОБАКТЕРА З ҐРУНТУ АГРОФІТОЦЕНОЗУ ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ ЗА РІЗНИХ СИСТЕМ ЇЇ УДОБРЕННЯ**

**Шерстобєва О.В., Вага Л.І.**

Інститут агроєкології і економіки природокористування НААН,  
вул. Метрологічна, 12, м. Київ, 03143  
E-mail: ovcher@ukr.net

*Дослідженнями встановлено, що в агрофітоценозі пшениці озимої на чорноземі типовому Миронівського інституту пшениці ім. В.М. Ремесла НААН активно розвиваються *Azotobacter chroococcum* та *Azotobacter vinelandii*. Особливості удобрення мають суттєвий вплив на активність азотфіксації азотобактера, синтез рістрегулювальних речовин, фосфатмобілізацію та прояв антагонізму щодо фітопатогенних грибів.*

Ключові слова: *Azotobacter*; біологічна активність, система удобрення пшениці озимої.

Бактерії роду *Azotobacter* унікально пристосовані до вільного існування у ґрунті, адже майже всі представники цього роду є високоактивними азотфіксаторами та продукують речовини фітогормональної дії, органічні кислоти, вітаміни [3]. Більшість представників роду володіють здатністю мобілізувати важкорозчинні сполуки фосфору у ґрунті, продукуючи кислі продукти обміну в середовище. Описано штами, що продукують антибіотичні речовини антифунгальної та антибактеріальної дії [10]. Незважаючи на невимогливість до джерел вуглецю та енергії, тобто відсутність залежності від кореневих виділень, багато представників роду *Azotobacter* адаптуються до умов ризосфери рослин [8].

Важливе значення для формування родючості ґрунту, яке має азотобактер, спонукає до отримання його високоактивних штамів з комплексом агрономічно корисних властивостей та застосування їх у практиці сільського господарства, а також вивчення залежності біологічної активності культур азотобактера від умов екотопу їх існування.

**Матеріали і методи.** Зразки ґрунту відбирали за ДСТУ 17.4.02-84 у 2007 році на стаціонарному досліді Миронівського інституту пшениці ім. В.М. Ремесла НААН, який розташовано в Київській області, в зоні правобережного Лісостепу. Тип

грунту – чорнозем глибокий малогумусний слабовилугований, середньосуглинкового гранулометричного складу, рН 5,6, вміст у орному шарі гумусу 3,58–4,18 %, рухомого фосфору (за Труогом) 128–189 мг/кг, обмінного калію (за Масловою) 95–127 мг/кг ґрунту, гідролітична кислотність у межах 1,7–2,2 мг-екв./100 г ґрунту. Бактеріальні ізоляти виділяли з ґрунту кореневої зони рослин пшениці озимої сорту Миронівська 67, яка вирощувалась за мінеральної, органічної та органо-мінеральної систем удобрення.

Мікробіологічні дослідження проводили загальноприйнятими методами, наведеними у посібнику МДУ [6]: чисельність бактерій роду *Azotobacter* визначали методом аплікацій на поверхню агаризованого середовища Ешбі; прояв антагонізму штамами азотобактера до фітопатогенних мікроміцетів визначали методом зустрічних штрихів та агарових блоків, вимірюючи зону пригнічення росту тест-культур фітопатогенних грибів; синтез і виділення речовин рістрегулювальної дії визначали за приростом коренів проростків редису; здатність бактеріальних ізолятів мобілізувати важкорозчинні мінеральні фосфати досліджували за утворенням навколо колоній прозорої зони розчиненого трикальційфосфату на середовищі Муромцева; нітрогеназну активність – методом ацетиленредукції, залишок глюкози у середовищі – за Бертраном.

Визначення виду найактивніших ізолятів азотобактера проводили традиційними методами за ідентифікаційними тест-ознаками: рухливістю, формою та розміром клітин, утворенням цист та слизу, кольором пігментів і їхньою розчинністю у воді та здатністю проникати в агар, спроможністю засвоювати певні види цукрів [7].

Морфологію колоній вивчали на агаризованому середовищі Ешбі. На середовищі, збідненому на залізо, спостерігали за утворенням пігментів та їх проникненням в агар упродовж десяти діб. Здатність бактерій до утворення цист та слизу відмічали на 6 добу культивування. Морфологію та розміри клітин визначали в стабілізованих підсушуванням культурах, користуючись об'єкт-мікроскопом марки ОШ-2 з точністю шкали 0,001 мкм. Рух клітин описували шляхом мікроскопіювання одnodобових культур за допомогою фазово-контрастного пристрою до мікроскопу фірми Carl Zeiss Jena марки Laboval-4.

Математичний аналіз одержаних результатів проводили за використання стандартних комп'ютерних програм Excel та

«Статистика» [5].

**Результати та обговорення.** Проводячи системне дослідження природних мікробних ценозів ґрунтів України, Г.О. Іутинська з співавт. [1, 3] визначили, що продуктивність засвоєння азоту окремими штаммами азотобактера коливається у широкому діапазоні, і найактивніші з них зв'язують 8–14 мг азоту на 1 г використаного джерела вуглецю.

Ми провели аналогічне дослідження з бактеріями роду *Azotobacter*, виділеними із ґрунту ділянок з різними варіантами удобрення, тобто із екотипів їхнього існування за різного рівня забезпечення біогенними елементами. Результати аналізу показали, що продуктивність азотфіксації ізолятів азотобактеру з ґрунту міжрядь та ризосфери пшениці озимої коливалась від 0,5 до 16 мг на 1 г окисленої глюкози.

Найбільшу кількість високоактивних азотфіксувальних ізолятів виділено в фазу трубкування рослин, що можна пояснити оптимальним рівнем температурного режиму для процесу біологічної фіксації азоту та підвищеною потребою рослин в азотних сполуках у найактивніший період вегетативного росту.

Вирощування пшениці озимої за органо-мінерального удобрення сприяє розвитку і домінуванню в її кореневій зоні ізолятів азотобактеру з рівнем продуктивності 7,7–16,0 мг азоту на 1 г окисленої глюкози (табл. 1). У ґрунті контрольного варіанту, де пшеницю вирощували без удобрення, домінували ізоляти, що фіксували до 3,8 мг азоту на 1 г засвоєної глюкози.

Функції азотобактера в кореневій системі не обмежуються засвоєнням азоту повітря, бактерії можуть впливати прямо і опосередковано на розвиток рослин шляхом утворення ростових речовин. Відомо, що внесення азотних мінеральних добрив інгібує біологічну фіксацію азоту з атмосфери, але їх застосування є обов'язковим елементом агротехнологій вирощування сільськогосподарських культур, тому продукування біологічно активних речовин бактеріями роду *Azotobacter* за таких умов визнається як більш значущий фактор, ніж фіксація азоту [4, 9].

У нашому дослідженні стимуляцію росту рослинної тест-культури виявлено за дії на неї метаболітів усіх ізолятів азотобактера. Але приріст коренів редису був найбільшим у ізоляту із зразків ґрунту посіву пшениці озимої за удобрення її  $N_{60}P_{40}K_{40}$ , і становив 96 %. На 50–58 % підвищували ріст коренів метаболіти

культур, виділених із ризосфери пшениці озимої, що вирощувалась без добрив та за мінерального її удобрення. Найменше стимулювали ріст тест-культури ізоляти з ризосферного ґрунту рослин пшениці озимої за вирощування по органічному і органо-мінеральному фонах.

**Таблиця 1. Біологічна активність бактерій роду *Azotobacter*, що домінують у ґрунті агрофітоценозу пшениці озимої**

№№ ізоляту	Удобрення	Продуктивність азотфіксації, мг N <sub>2</sub> /г цукру	Стимуляція росту проростка, %	Прозора зона, мм	
				розчинення трикальцій фосфату	пригнічення росту грибів
4М	контроль без добрив	3,8±0,25	50,0±1,8	1,1±0,2	0
5М	N <sub>60</sub> P <sub>40</sub> K <sub>40</sub>	0,5±0,03	96,2±2,7	0,7±0,1	0
6М	N <sub>60</sub> P <sub>40</sub> K <sub>40</sub>	6,2±0,50	57,7±1,6	0,7±0,1	0
9М-1	Гній 30 т/га	7,7±0,69	38,5±1,4	0	0
9М-2	Гній 30 т/га	16,0±0,36	42,3±1,6	1,7±0,1	0
11М	N <sub>60</sub> P <sub>40</sub> K <sub>40</sub> + гній 30 т/га	8,4±0,29	42,3±15,4	1,0±0	0
12М	N <sub>60</sub> P <sub>40</sub> K <sub>40</sub> + гній 30 т/га	10,1±0,22	46,2±2,1	2,7±0,2	14,4±0,7

Визначення здатності азотобактера мобілізувати важкорозчинні мінеральні фосфати дозволило виявити, що при рості на твердому середовищі Муромцева більшість ізолятів утворюють навколо колоній прозору зону розчиненого ортофосфату кальцію. Найбільші зони розчинення (1,7 і 2,7 мм) виявлено у ізолятів 9М-2 і 12М, виділених із ґрунту посіву пшениці озимої за органічного та органо-мінерального удобрення, відповідно.

В літературі є свідчення щодо виділення з природних біоценозів штамів азотобактеру, які продукують речовини антибіотичної дії [1, 9, 10]. Серед отриманих нами бактеріальних культур здатність пригнічувати ріст тест-культур фітопатогенних грибів проявив

ізолят 12 М, виділений із ризосфери рослин пшениці озимої, вирощуваної за орґано-мінерального удобрення. Для прикладу, навколо його колоній утворювалися зони пригнічення росту збудника гельмінтоспориозної гнилі на рівні 14,7 мм.

Слід зазначити, що аналіз наведених вище даних дав змогу виявити лише один ізолят азотобактеру, який будучи активним азотфіксатором, володіє здатністю до мобілізації фосфору з ортофосфату кальцію і продукує речовини стимулювальної та антибіотичної дії. Цей ізолят (за номером 12 М) виділено з агрофітоценозу пшениці, вирощуваної за орґано-мінерального удобрення.

Ідентифікацію до виду проводили лише з ізолятами, найактивнішими за певною з досліджених ознак. Їх морфологічні, культуральні та біохімічні особливості наведено в табл. 2.

**Таблиця 2. Ідентифікаційні ознаки найактивніших штамів бактерій роду *Azotobacter* з чорнозему типового стаціонарного досліді МІП НААН**

Вид, штамі	Форма клітин	Рухливість		Утворення			Засвоєння
		цист		пігментів	слизу	крохмало	маніту
<i>A. chroococcum</i> 4М	овальна паличка	+	+	чорний, водонерозчинний	+	+	+
<i>A. chroococcum</i> 5М	коковидна	+	+	темно-коричневий, водонерозчинний	+	+	+
<i>A. chroococcum</i> 6М	коковидна	+	+	темно-коричневий, водонерозчинний	+	+	+
<i>A. vinelandii</i> 9М	паличко-видна	+	+	зелений, водорозчинний, флуоресцентний	+	-	+
<i>A. chroococcum</i> 11М	овальна паличка	+	+	темно-коричневий, водонерозчинний	+	+	+
<i>A. vinelandii</i> 12М	паличко-видна	+	+	зелений, водорозчинний, флуоресцентний	+	-	+

На основі проведених ідентифікаційних тестів ізоляти 4М, 5М, 6М, 11М віднесено до виду *Azotobacter chroococcum*. Клітини цих бактерій в однодобовій культурі рухливі, мають форму або овальних паличок, або коковидну. Клітини найчастіше поодинокі та з'єднані попарно, зрідка з'єднані в ланцюжок. У культурах наявний пігмент від темно-коричневого до чорного кольору, який не розчиняється в воді і не дифундує в агар. Ці штами здатні засвоювати крохмаль та маніт, утворюють цисти та багато капсульного слизу.

Ізоляти 12М, 9М-1, 9М-2 визначено як *Azotobacter vinelandii*. Клітини рухливі, паличковидної форми, розміром 1,6–1,8×3,1–4,5 мкм, утворюють флуоресцентний пігмент жовто-зеленого кольору, що дифундує у середовище. Також утворюють цисти та капсульний слиз. Не здатні до засвоєння крохмалю.

Отже, у чорноземі типовому стаціонарного досліджу Миронівського інституту пшениці ім. В.М. Ремесла НААН активно розвиваються представники видів *A. chroococcum* та *A. vinelandii*. Найбільшою продуктивністю щодо засвоєння молекулярного азоту характеризуються штами азотобактера, які ізолювано з ризосфери рослин пшениці озимої, вирощуваної за органічного та органо-мінерального удобрення. Найактивнішими продуцентами рістстимулювальних речовин виявилися штами, що виділено з ґрунту, збагаченого легкодоступними мінеральними речовинами. Штами азотобактера – фосфатмобілізатори або антагоністи фітопатогенних грибів виділено з ґрунту різних варіантів удобрення пшениці озимої, тобто ці властивості мало залежали від агрофонів.

1. Біологічний азот: монографія /[Патика В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В. і ін.]; за ред. В.П. Патики – К.: Світ, 2003. – 424 с.

2. Благовещенская Г.Г. Микробные сообщества почв и их функционирование в условиях применения средств химизации /Г.Г. Благовещенская, Т.М. Духанина //Агрохимия. – 2004. – № 2. – С. 80–88.

3. Иутинская Г.А. Экологическая пластичность свободноживущих diaзотрофов в почвах, загрязненных тяжелыми металлами /Иутинская Г.А., Антипчук А.Ф., Андреюк Е.И. //Микробиол. журн. – 1997. – Т. 59, № 4. – С. 83–90.

4. Каменева И.А. Использование микробных препаратов при выращивании табака /И.А. Каменева, Е.В. Шерстобоева, А.А. Лунгул //Научные труды Крымского госуниверситета. С.-г. науки. – 2002. –

Вып. 72. – С. 50–54.

5. Царенко О.М. Комп'ютерні методи в сільському господарстві та біології / [Царенко О.М., Злобин Ю.А., Скляр В.Г., Панченко С.М.]. – Суми: Університетська книга, 2000. – 204 с.

6. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под. ред Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 303 с.

7. Определитель бактерий Берджи / [Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит и др.]; под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. – 432 с.

8. Шерстобоева О.В. Роль мікробіологічних препаратів у підвищенні продуктивності рослин екологічно безпечними засобами / Шерстобоева О.В. // Физиол. и биохим. культурн. раст. – 2004. – № 3. – С. 229–238.

9. Чернова Л.С. *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 – перспективный продуцент биологически активных веществ для растениеводства / Л.С. Чернова, И.К. Курдиш // Матер. IV Междунар. конфер. «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 26–28 октября, 2005 г.). – Минск, 2005. – С. 243.

10. Шерстобоева О.В. Поліфункціональна активність азотобактеру в ґрунтах Лісостепу України / О.В. Шерстобоева, Л.І. Федак // Агрокол. журн. – 2009. – червень. – С. 351–354.

## **АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ АЗОТОБАКТЕРА ИЗ ПОЧВЫ АГРОФИТОЦЕНОЗА ПШЕНИЦЫ ОЗИМОЙ ПРИ РАЗНЫХ СИСТЕМАХ ЕЕ УДОБРЕНИЯ**

**Шерстобоева Е.В., Вага Л.И.**

Институт агроэкологии и экономики природопользования НААН,  
г. Киев

*В агрофитоценозе пшеницы озимой на черноземе типичном Мироновского института пшеницы им. В.М. Ремесло НААН активно развиваются *Azotobacter chroococcum* и *Azotobacter vinelandii*. Особенности удобрения имеют существенное влияние на активность азотфиксации азотобактера, синтез рострегулирующих веществ, фосфатмобилизацию и проявление антагонизма к фитопатогенным грибам.*

Ключевые слова: *Azotobacter*; биологическая активность, удобрение пшеницы озимой.

**ACTIVITY OF AZOTOBACTER FROM SOIL  
OF WHEAT WINTER AGROPHYTOCOENOSIS  
AT THE DIFFERENT SYSTEMS OF ITS FERTILIZER**

**Sherstoboeva O.V., Vaga L.I.**

Institut of Agroecology and Nature Management NAAS

*Azotobacter chroococcum and Azotobacter vinelandii are actively developing in in wheat agropgytocenosis on typical chernozem soils of the Myronivsky wheat institute named after V.M. Remeslo NAAS. Peculiarities of fertilization have a significant effect on the nitrogen-fixing activity of Azotobacter, synthesis of growth regulating substances, mobilization of phosphorous and its antagonism to the phytopathogenic fungi.*

*Key words: Azotobacter, biological activity, winter wheat, fertilization.*